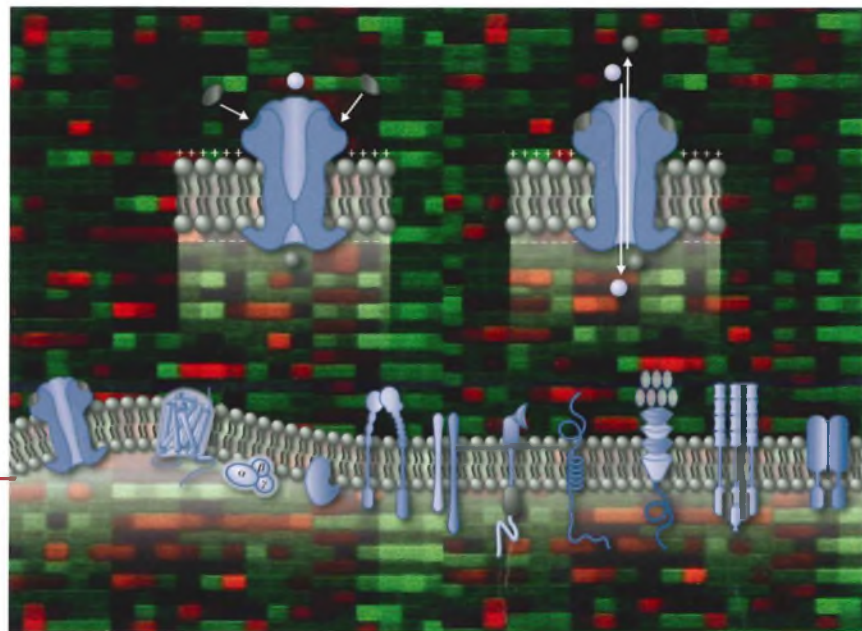


Francesco Clementi Guido Fumagalli

Farmacologia generale e molecolare



Quarta edizione

CONTIENE CD-ROM





Francesco Clementi • Guido Fumagalli

Co-Editors

Cristiano Chiamulera • Emilio Clementi • Riccardo Fesce • Diego Fornasari

FARMACOLOGIA GENERALE E MOLECOLARE

Il meccanismo d'azione dei farmaci

QUARTA EDIZIONE

SISTEMA BIBLIOTECARIO DI ATENE0 - SALERNO



00316260



CENTRO BIBLIOTECARIO

DI ATENE0

5642

N. INGRESSO



UTET
SCIENZE MEDICHE

La Casa Editrice si dichiara disponibile a regolare eventuali spettanze per le immagini di cui non sia stato possibile recuperare la fonte.

I lettori che desiderano comunicare con gli autori possono richiedere alla segreteria di redazione della Casa Editrice (paola.mapelli@utetmed.it) l'indirizzo e-mail dell'autore che vorrebbero contattare.

© 2012 Quarta edizione
UTET SpA – Unione Tipografico-Editrice Torinese
Lungo Dora Colletta, 67 - 10153 Torino

© 2004 Terza edizione

© 1999 Seconda edizione

© 1996 Prima edizione - Unione Tipografico-Editrice Torinese

e-mail: marketing@utetmed.it

I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica, di riproduzione e di adattamento totale o parziale, con qualsiasi mezzo (microfilm e copie fotostatiche compresi), sono riservati per tutti i Paesi.

Le fotocopie per uso personale del lettore possono essere effettuate nei limiti del 15% di ciascun volume/fascicolo di periodico dietro pagamento alla SIAE del compenso previsto all'art. 68, commi 4 e 5 della legge 22 aprile 1941 n. 633.

Le riproduzioni effettuate per finalità di carattere professionale, economico o commerciale o comunque per uso diverso da quello personale possono essere effettuate a seguito di specifica autorizzazione rilasciata da AIDRO, Corso di Porta Romana, 108, 20122 Milano, e-mail segreteria@aidro.org e sito web www.aidro.org

Coordinamento editoriale e redazione
Astralon snc - Milano

Realizzazione grafica e impaginazione
T&T studio, Milano

Stampa
Stamperia Artistica Nazionale, Trofarello (TO)

ISBN 978-88-02-08558-6

Autori

Editors

FRANCESCO CLEMENTI

Professore emerito di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

GUIDO FUMAGALLI

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Verona

Co-editors

Cristiano Chiamulera

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Verona

Emilio Clementi

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Riccardo Fesce

Professore di Fisiologia,
Università degli Studi dell'Insubria,
sede di Busto Arsizio (Varese)

Diego Fornasari

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Autori

Maria Pia Abbraccio

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Lucio Annunziato

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi "Federico II", Napoli

Lorenzo Arnaboldi

Borsista in Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Francesco Autuori

Professore di Biologia Cellulare e dello Sviluppo,
Università degli Studi "Tor Vergata", Roma

Giacinto Bagetta

Professore di Farmacologia,
Università della Calabria, Arcavacata di Rende (CS)

Michela Bagnalasta

Regional Medical Manager,
GlaxoSmithKline SpA, Verona

Roberta Benfante

Ricercatore CNR, Istituto di Neuroscienze,
Sezione di Milano

Giovanni Luca Beretta

Ricercatore di Farmacologia,
Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Giorgio Berton

Professore di Patologia Generale,
Università degli Studi di Verona

Giovanni Biggio

Professore di Neuropsicofarmacologia,
Università degli Studi di Cagliari

Francesco Blasi

Istituto FIRC di Oncologia Molecolare (IFOM),
Milano

Carla Boccaccio

Professore di Istologia,
Università degli Studi di Torino

Simone Braggio

Direttore Dipartimento di Farmacocinetica e Metabolismo, Aptuit, Verona

Paolo M. Camoglio

Professore di Istologia, Università degli Studi di Torino

Sanzio Candeletti

Ricercatore di Farmacologia, Università degli Studi di Bologna

Orazio Cantoni

Professore di Farmacologia, Università degli Studi "Carlo Bo", Urbino

Valérie Capra

Senior Investigator, Università degli Studi di Milano

Achille P. Caputi

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Messina

Maria Antonietta Catania

Specialista in Tossicologia Medica, Università degli Studi di Messina

Flaminio Cattabeni

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Dario Cattaneo

Dirigente S.P.T.A., U.O. di Farmacologia Clinica, Azienda Ospedaliera Luigi Sacco, Milano

Elena Cattaneo

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Maria Grazia Cattaneo

Ricercatore di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Stefania Ceruti

Assegnista di Ricerca in Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Cristiano Chiamulera

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Verona

Enzo Chiesara

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Emilio Clementi

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Francesco Clementi

Professore emerito di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Luciano Conti

Ricercatore di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Alberto Corsini

Professore di Farmacologia e Farmacoterapia, Università degli Studi di Milano

Salvatore Cuzzocrea

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Messina

Clara De Palma

Ricercatore di Farmacologia, Azienda Ospedaliera Luigi Sacco, Milano

Angela De Sarro

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Messina

Gaetano Di Chiara

Professore di Farmacologia e Farmacoterapia, Università degli Studi di Cagliari

Fabio Di Lisa

Professore di Biochimica, Università degli Studi di Padova

Monica Di Luca

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Gianfranco Di Renzo

Professore di Farmacologia, Università degli Studi "Federico II", Napoli

Giuseppina Fava

Specialista in Tossicologia Medica e in Farmacologia, Università degli Studi di Messina

Nicola Ferri

Borsista in Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Riccardo Fesce

Professore di Fisiologia, Università degli Studi dell'Insubria, sede di Busto Arsizio (Varese)

Diego Fornasari

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Valerio Fulci

Ricercatore di Biologia Applicata, "Sapienza" Università di Roma

Guido Fumagalli

Professore di Farmacologia, Università degli Studi di Verona

Fabrizio Gardoni

Ricercatore di Farmacologia, Università degli Studi di Milano

Laura Gatti

Ricercatore di Farmacologia,
Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Silvia Giordano

Professore di Istologia,
Università degli Studi di Torino

Cecilia Gotti

Dirigente di Ricerca, CNR, Istituto di Neuroscienze,
Sezione di Milano

Roberta Lattanzi

Ricercatore di Farmacologia,
"Sapienza" Università di Roma

Carlo Laudanna

Professore di Patologia Generale,
Università degli Studi di Verona

Massimo Locati

Professore di Patologia Generale e Immunologia,
Università degli Studi di Milano

Giuseppe Macino

Professore di Biologia Applicata,
"Sapienza" Università di Roma

Adriana Maggi

Professore di Biotecnologie Farmacologiche,
Università degli Studi di Milano

Alberto Mantovani

Professore di Patologia Generale,
Università degli Studi di Milano

Laura Marabini

Ricercatore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Emanuela Masini

Professore di Farmacologia e Tossicologia,
Università degli Studi di Firenze

Michela Matteoli

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Jacopo Meldolesi

Professore Emerito di Farmacologia Generale,
Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

Edon Melloni

Professore di Biochimica,
Università degli Studi di Genova

Maurizio Memo

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Brescia

Elisabetta Menna

Ricercatore, CNR, Istituto di Neuroscienze,
Sezione di Milano

Graziella Migliorati

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Perugia

M. Cristina Missale

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Brescia

Paolo Moghetti

Professore di Endocrinologia,
Università degli Studi di Verona

Flavio Moroni

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Firenze

Laura Musazzi

Assegnista di Ricerca in Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Lucia Negri

Professore di Farmacologia,
"Sapienza" Università di Roma

Giuseppe Nisticò

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi "Tor Vergata", Roma

Ennio Ongini

Vice Presidente Ricerca, Nicox, Bresso (Milano)

Daniela Parolaro

Professore di Farmacologia Cellulare e Molecolare,
Università degli Studi dell'Insubria,
sede di Busto Arsizio (Varese)

Paola Patrignani

Professore di Farmacologia,
Università "G. d'Annunzio", Frosinone

Carlo Patrono

Professore di Farmacologia,
Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Mario Pellegatti

Direttore Dipartimento di Farmacocinetica e Metabolismo,
GlaxoSmithKline, Verona

Giancarlo Pepeu

Professore Emerito di Farmacologia,
Università degli Studi di Firenze

Paola Perego

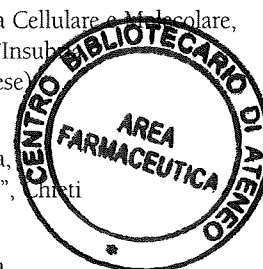
Ricercatore di Farmacologia,
Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

Mauro Piacentini

Professore di Biologia Cellulare e dello Sviluppo,
Università degli Studi "Tor Vergata", Roma

Giuseppe Pignataro

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi "Federico II", Napoli



Maurizio Popoli

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Giorgio Racagni

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Sonia Radice

Dirigente Biologo, U.O. di Farmacologia Clinica,
Azienda Ospedaliera Luigi Sacco, Milano

Carlo Riccardi

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Perugia

Patrizia Romualdi

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Bologna

G. Enrico Rovati

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Tiziana Rubino

Ricamatore di Farmacologia,
Università degli Studi dell'Insubria,
sede di Busto Arsizio (Varese)

Enrico Sanna

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Cagliari

Francesco Scaglione

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Mariangela Serra

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Cagliari

Sandra Sigala

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Brescia

Vittorio A. Sironi

Professore di Storia della Medicina e della Sanità
Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milano

Pier Franco Spano

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Brescia

Angelo Spinedi

Professore di Fisiologia,
Università degli Studi "Tor Vergata", Roma

Maurizio Tagliatela

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi del Molise, Campobasso

Lucia Vallar

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Flavia Valtorta

Professore di Farmacologia,
Università Vita-Salute San Raffaele, Milano

Elisabetta Vegeto

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Claudia Verderio

Primo Ricamatore, CNR, Istituto di Neuroscienze,
Sezione di Milano

Lucia Vicentini

Professore di Farmacologia,
Università degli Studi di Milano

Enzo Wanke

Professore di Fisiologia,
Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milano

Giacomo Zoppini

Ricamatore di Endocrinologia,
Università degli Studi di Verona

Prefazione alla quarta edizione

*“... Siate fieri di aver scelto nella farmacologia
la più dinamica e la più impegnativa tra le scienze mediche.”*

da una lettera del professor Emilio Trabucchi ai suoi allievi

Solo pochi anni sono passati dalla terza edizione e la scienza e la ricerca hanno corso più di quanto potevamo prevedere. La conoscenza non ammette soste, non permette ignoranza e deve cercare ed esplorare sempre nuove frontiere. Ormai da quindici anni abbiamo scelto il compito arduo e impegnativo di condensare il conosciuto farmacologico sfrondandolo il più possibile di pesi inutili e dispersivi, di cogliere le novità, di intuire quali di queste porteranno frutti maturi e proporle ai docenti e agli studenti.

La linea che abbiamo seguito per affrontare questo compito è quella delineata nella prima edizione: lo studio del farmaco come strumento terapeutico ma anche quale mezzo necessario per analizzare i fenomeni cellulari e molecolari che regolano la vita e la patologia degli organismi. È nostra convinzione che solo attraverso questa via si possa affrontare un processo serio di drug discovery e che solo la conoscenza approfondita del meccanismo d'azione dei farmaci permetta un loro uso clinico corretto e uno sviluppo sempre più razionale della farmacologia e delle scienze biomediche di base.

Tutti i capitoli sono stati aggiornati, alcuni in modo consistente, perché tanti sono stati i mutamenti, anche metodologici e culturali, avvenuti. Altri capitoli sono stati aggiunti ex novo per completare il quadro e per accogliere le novità più significative. Tra le molte cose nuove abbiamo sviluppato la parte metodologica e culturale della ricerca innovativa in farmacologia, della farmacologia clinica, della farmacoepigenetica e farmacogenomica e della personalizzazione della terapia. Abbiamo anche approfondito gli aspetti relativi alla farmacologia dello stress ossidativo e dell'infiammazione.

L'aumento delle conoscenze in questi ultimi cinque anni e l'interazione della farmacologia con le discipline più disparate, dalle biotecnologiche alle informatiche, dalle mediche alle fisiche e alle chimiche, hanno reso molto ardua la stesura di un testo di base di farmacologia che fosse contenuto in un numero di pagine sopportabile per uno studente universitario al suo primo approccio alla farmacologia. Nello stesso tempo non volevamo perdere una delle caratteristiche di questo libro, che è quella di presentare e approfondire le nuove conoscenze che saranno alla base degli sviluppi futuri della farmacologia.

Per ottemperare a queste esigenze abbiamo diviso il volume in due parti: il volume stampato su supporto cartaceo, che contiene la base rilevante della farmacologia generale e molecolare, e il CD allegato al libro, che contiene invece gli approfondimenti e gli spunti per uno studio più meditato, coinvolgente e stimolante della farmacologia fornendo collegamenti numerosi e dettagliati su argomenti più di frontiera o in discussione. Abbiamo così anche potuto ampliare la parte storica cercando di mostrare la strada fatta in questi anni dalla farmacologia italiana. Come risulta dall'indice, ambedue le parti fanno parte di un unico progetto integrato che può essere “sfogliato” a seconda dei diversi percorsi di studio e degli interessi del lettore.

In entrambe le parti abbiamo cercato di mantenere un'esposizione chiara, semplice ma non semplicistica, con abbondanza di schemi e di illustrazioni. Nel CD, dotato di un

motore di ricerca semplice ma efficace, sono anche riportate tutte le figure, le tabelle e l'indice analitico presenti nel volume cartaceo.

La nostra speranza è che il testo, anche attraverso questa ultima novità, continui a essere un punto di riferimento che permanga al di là delle esigenze di un singolo corso e delle necessità dell'esame.

In quest'opera di revisione siamo stati aiutati da molti docenti. Alcuni di questi ci avevano affiancato già nelle precedenti edizioni, ma molti sono nuovi: tutti ci hanno seguito con professionalità e pazienza cercando di mantenere il testo aderente alle necessità formative dello studente. A loro un grazie vivissimo.

Cristiano Chiamulera, Emilio Clementi, Riccardo Fesce e Diego Fornasari hanno condiviso con noi le scelte editoriali e hanno contribuito con la loro esperienza didattica e scientifica alla realizzazione dell'opera.

Siamo anche molto grati alla casa editrice UTET che ha seguito questo progetto editoriale con molta attenzione e lungimiranza e che lo ha realizzato attraverso collaboratori di grande professionalità.

Quando si licenzia un lavoro rimane sempre l'ansia di aver lasciato errori, imprecisioni, cose non chiare, di non aver scelto i giusti argomenti, di non aver ben bilanciato semplicità verso complessità. Speriamo che i lettori, gli studenti, i docenti ci perdonino le eventuali mancanze e apprezzino la nostra buona volontà e il nostro desiderio di contribuire a mantenere alta la cultura farmacologica nella nostra Università in un momento così difficile e, per molti versi, desolante e triste.

In questi momenti ricordiamo sempre con commozione e riconoscenza i nostri "maestri" che ci hanno aiutato a crescere in questa disciplina con coraggio, infondendoci la passione per la ricerca, la gioia e la responsabilità di tramandare il sapere e la "speranza contro ogni speranza" nella vita quotidiana di ricercatori e docenti.

FRANCESCO CLEMENTI GUIDO FUMAGALLI

Indice

Autori.....	V
Prefazione alla quarta edizione.....	IX

SEZIONE 1

Introduzione alla farmacologia

CAPITOLO 1

Principi di farmacologia.....	3
-------------------------------	---

Francesco Clementi, Guido Fumagalli

Lessico essenziale.....	4
Sostanze attive.....	4
Discipline che studiano i farmaci.....	6
Interazioni tra un farmaco e i sistemi viventi.....	7
Misura degli effetti.....	7

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 1

1.1 Terapie alternative o non convenzionali Francesco Clementi	
---	--

CAPITOLO 2

Breve storia della farmacologia.....	9
--------------------------------------	---

Vittorio A. Sironi

Nascita ed evoluzione della farmacologia.....	9
La medicina primitiva e antica: rimedi magici e naturali.....	9
Il razionalismo greco e romano.....	9
Tra alchimia e magia naturale.....	10
Dalla medicina monastica agli orti botanici.....	10
Dal rinascimento anatomico alla "Experienz": la spagirica di Paracelso.....	11
Dalla iatrochimica ai lumi della ragione scientifica ..	12
Dalla ricerca del principio attivo alla scoperta di alcaloidi e glicosidi.....	13
La rivoluzione dei farmaci di sintesi: dalla produzione artigianale alla fabbricazione industriale.....	13
La farmacologia moderna.....	14
Ehrlich e la chemioterapia: il concetto di recettore ..	14
Sulfamidici e antibiotici: dalla farmacologia sperimentale alla farmacologia terapeutica.....	14

Antistaminici e psicofarmaci: nasce la farmacologia moderna.....	15
L'esplosione farmacoterapica e gli sviluppi della farmacologia.....	16
L'era biotecnologica.....	17
L'impatto delle nuove tecnologie.....	17
L'ingegneria genetica: dal DNA ricombinante al Progetto Genoma Umano.....	17
Chimica combinatoriale e bioinformatica.....	18
I farmaci biotecnologici e le prospettive della farmacologia.....	19
La farmacologia del terzo millennio.....	20
Il mondo degli "omics" e le nuove regole dell'industria farmaceutica.....	20
Nanotecnologie e farmaci molecolari.....	20
La farmacologia di genere: farmaci maschili e femminili.....	21
Bibliografia essenziale.....	22

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 2

2.1 I farmaci degli antichi Vittorio A. Sironi	
2.2 La nascita dell'industria farmaceutica in Italia Vittorio A. Sironi	
2.3 La chemioterapia di Ehrlich: la teoria dei recettori e la sperimentazione clinica Vittorio A. Sironi	
2.4 Il caso talidomide Vittorio A. Sironi	
2.5 La rinascita della farmacologia italiana nel secondo dopoguerra Vittorio A. Sironi	

CAPITOLO 3

Ricerca preclinica e sviluppo di nuovi farmaci ...	23
Ennio Ongini	
Innovazione tecnologica e conoscenze scientifiche nella ricerca farmaceutica moderna.....	23
Strategie di ricerca.....	25
Le fasi della ricerca.....	26
Le fasi dello sviluppo.....	31
I farmaci del 2020.....	33

Bibliografia essenziale.....	34
Sitologia	34

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 3

3.1 Il contributo significativo dei piccoli gruppi di ricerca (<i>start-up</i> e <i>spin-off</i>) Ennio Ongini	
3.2 High-Throughput Screening Ennio Ongini	
3.3 Come nasce un progetto su un nuovo farmaco Ennio Ongini	
3.4 Il brevetto Ennio Ongini	
3.5 I farmaci biotech Ennio Ongini	
3.6 I test di tossicologia Ennio Ongini	
3.7 Safety pharmacology: come valutare se le nuove molecole inducono effetti collaterali sulle funzioni vitali Ennio Ongini	
3.8 Drug delivery Ennio Ongini	

CAPITOLO 4

Metodologia della sperimentazione clinica dei farmaci.....	35
Carlo Patrono	
Fasi della sperimentazione clinica.....	36
Studi osservazionali e trial clinici randomizzati	37
L'importanza dell'ipotesi primaria.....	38
Definizione dell'end-point primario e sua importanza per stabilire la validità di un trial	38
Analisi dei risultati	40
Valutazione comparativa di benefici e rischi di un trattamento farmacologico	41
Uno sguardo al futuro	42
Bibliografia essenziale	43

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 4

4.1 Glossario di metodologia di ricerca clinica Michela Bagnalasta	
4.2 Il placebo Francesco Clementi	

SEZIONE 2

Recettori e trasduzione del segnale

CAPITOLO 5

Aspetti quantitativi e qualitativi dell'interazione farmaco-recettore.....	47
G. Enrico Rovati, Valérie Capra	
Generalità e proprietà del recettore.....	47
Caratteristiche dell'interazione farmaco-recettore...	49

Aspetti quantitativi delle risposte ai farmaci:	
analisi delle curve dose-risposta.....	53
Definizione dei termini potenza ed efficacia.....	53
Relazioni fra interazione farmaco-recettore e risposta.....	54
Teoria dell'occupazione	54
Modificazioni alla teoria dell'occupazione.....	55
Teoria dell'efficacia o attività intrinseca.....	57
Non linearità della relazione tra occupazione e risposta: EC_{50} e K_d non coincidenti	59
Recettori costitutivamente attivi e agonisti inversi...	60
Bibliografia essenziale.....	62

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 5

5.1 Metodiche di studio dei recettori G. Enrico Rovati, Valérie Capra	
5.2 Esecuzione di studi di binding G. Enrico Rovati, Valérie Capra	

CAPITOLO 6

Recettori e modulazione delle risposte recettoriali.....	63
Francesco Clementi, Guido Fumagalli	
Classi di recettori e loro sistemi di trasduzione del segnale.....	63
Recettori intracellulari/intranucleari.....	64
Recettori di membrana.....	64
Controllo della localizzazione dei recettori sulla membrana cellulare.....	71
Trasporto e traffico cellulare dei recettori	72
Modulazione delle risposte recettoriali	72
Modulazione delle risposte recettoriali ai farmaci...	73
Bibliografia essenziale.....	74

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 6

6.1 Nascita ed evoluzione della teoria dei recettori Francesco Clementi, Guido Fumagalli, Vittorio A. Sironi	
6.2 La regolazione della risposta recettoriale Francesco Clementi, Guido Fumagalli	
6.3 Il traffico intracellulare dei recettori Francesco Clementi, Guido Fumagalli	

CAPITOLO 7

Adattamento della risposta alle sostanze e tossicodipendenza.....	75
Cristiano Chiamulera	
Definizione dei concetti di adattamento, allostasi e omeostasi	75
L'adattamento molecolare, cellulare e sistemico.....	76
L'adattamento cellulare.....	76
Effetti dell'esposizione ripetuta alle sostanze	77
Tolleranza.....	77
Sensibilizzazione.....	77
Sindrome da cessazione e crisi d'astinenza fisica e psicologica	78

La tossicodipendenza come paradigma di adattamento allostatico	78
Adattamento e stadi della tossicodipendenza	79
Ricerca e terapia della tossicodipendenza	82
Bibliografia essenziale	84

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 7

7.1 Una definizione moderna di memoria Cristiano Chiamulera	
7.2 Il condizionamento come processo psicologico alla base della tossicodipendenza Cristiano Chiamulera	
7.3 Tecniche di visualizzazione cerebrale utilizzate per lo studio della tossicodipendenza Cristiano Chiamulera	

CAPITOLO 8

Farmacologia delle modificazioni post-traduzionali	85
--	----

Monica Di Luca, Flavia Valtorta, Fabrizio Gardoni

Fosforilazione	86
Proteinchinasi	86
Proteinfosfatasi	88
Sumoilazione	89
Ubiquitinazione	90
Glicosilazione	91
Acetilazione	91
Idrossilazione	92
Carbossilazione	92
Metilazione	92
Nitrosilazione	92
Legami disolfuro	92
Aggiunta di lipidi	93
Aggiunta di glicosilfosfatidilinositoli	93
Bibliografia essenziale	94

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 8

8.1 Modulazione farmacologica di alcune importanti modificazioni post-traduzionali Monica Di Luca, Flavia Valtorta, Fabrizio Gardoni	
---	--

CAPITOLO 9

Regolazione dell'omeostasi del calcio intracellulare	95
--	----

Jacopo Meldolesi, Guido Fumagalli

Il citosol, crocevia di flussi di Ca^{2+}	95
La membrana plasmatica: canali, pompe e trasportatori	96
Il Ca^{2+} negli organelli intracellulari	98
Il Ca^{2+} nella patologia cellulare	101

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 9

9.1 Proteine citosoliche che legano Ca^{2+} con alta affinità Jacopo Meldolesi	
---	--

9.2 Canali di superficie: TRP, Orai, SOCC e loro funzione Jacopo Meldolesi	
9.3 Le pompe al Ca^{2+} di superficie e dei depositi a rapido scambio Jacopo Meldolesi	
9.4 Proteine che legano Ca^{2+} nel lume dell'ER Jacopo Meldolesi	
9.5 Canali dell'ER: recettori dell'IP3 (IP3Rs) e della rianodina (RYRs) Jacopo Meldolesi	
9.6 Spikes localizzati danno origine a oscillazioni e onde di $[Ca^{2+}]_i$ Jacopo Meldolesi	
9.7 Il mitocondrio: un organello semiautonoma che ha bisogno dell'ER per funzionare Jacopo Meldolesi	
9.8 Anche il nucleo partecipa all'omeostasi del calcio Jacopo Meldolesi	

CAPITOLO 10

Farmacologia delle MAP chinasi	103
--------------------------------------	-----

Lucia Vicentini, Maria Grazia Cattaneo

Le famiglie di MAPK e i loro meccanismi di attivazione	103
Le ERK	104
Le JNK	105
Le p38	106
ERK5	107
La specificità d'azione delle MAPK	107
Inibizione farmacologica delle MAPK	108
Ras/Raf/MEK/ERK	108
JNK	109
p38	109
Bibliografia essenziale	109

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 10

10.1 Fosfatasi a doppia specificità come regolatori delle attività delle MAPK Lucia Vicentini, Maria Grazia Cattaneo	
10.2 Le MAPK nei processi di apprendimento e memoria e loro ruolo nelle patologie del SNC Lucia Vicentini, Maria Grazia Cattaneo	
10.3 L'attivazione delle ERK da parte di recettori accoppiati alle proteine G Lucia Vicentini, Maria Grazia Cattaneo	

CAPITOLO 11

Aspetti integrati della trasduzione intracellulare dei segnali recettoriali	111
---	-----

Jacopo Meldolesi

Dualismo recettoriale nucleo/citoplasma	111
Eterogeneità dell'assemblaggio recettoriale	112
Prospettive di sviluppo di nuovi farmaci e nuove terapie	114
Bibliografia essenziale	116

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 11

- 11.1** Le neurotrofine
Jacopo Meldolesi
- 11.2** Wnt e Hedgehog come possibili bersagli di farmaci
Jacopo Meldolesi

SEZIONE 3

Le classi recettoriali

CAPITOLO 12

I recettori-canale 119

Cecilia Gotti, Francesco Clementi

- Distribuzione tissutale e subcellulare dei recettori-canale 119
- Organizzazione molecolare dei recettori-canale 120
- Prima classe: famiglia dei recettori Cys-loop 120
- Seconda classe: recettori del glutammato 121
- Terza classe: recettori dei nucleotidi ciclici cGMP e cAMP 122
- Quarta classe: recettori ionotropici dell'ATP P2X ... 123
- Topografia dei recettori 123
- Localizzazione dei siti di legame per i ligandi endogeni 123
- Localizzazione e struttura del canale per gli ioni ... 127
- Superfamiglia dei recettori Cys-loop 127
- Recettori del glutammato, nucleotidi ciclici e ATP . 127
- Funzioni della porzione citoplasmatica 128
- Modulazione dell'attività dei recettori-canale 129
- Cross-talk con altri sistemi recettoriali 131
- Meccanismi d'azione dei farmaci che modulano l'attività dei recettori-canale 131
- Bibliografia essenziale 132

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 12

- 12.1** Evoluzione dei recettori Cys-loop
Cecilia Gotti
- 12.2** Come identificare i residui amminoacidici che si affacciano al lume del canale
Cecilia Gotti, Francesco Clementi

CAPITOLO 13

I recettori accoppiati alle proteine G 133

Lucia Vallar, Lucia Vicentini

- Organizzazione molecolare dei recettori accoppiati a proteine G 133
- Organizzazione molecolare e funzione delle proteine G 137
- I sistemi effettori 139
- Il sistema dell'adenilato ciclasi 140
- Lidrolisi dei fosfoinositidi 141
- Interazione dei recettori accoppiati alle proteine G con altre proteine 143
- Bibliografia essenziale 146

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 13

- 13.1** Recettori orfani
Maria Pia Abbraccio
- 13.2** Struttura e modificazioni conformazionali dei recettori accoppiati alle proteine G
Lucia Vallar, Lucia Vicentini
- 13.3** La superfamiglia delle GTPasi monomeriche come possibile bersaglio di farmaci
Lucia Vallar, Lucia Vicentini
- 13.4** Farmaci attivi sulle fosfodiesterasi
Lucia Vallar, Lucia Vicentini

CAPITOLO 14

I recettori per i fattori di crescita 147

Silvia Giordano, Carla Boccaccio, Paolo M. Comoglio

- Organizzazione molecolare dei recettori per i fattori di crescita 148
- Attivazione e trasduzione del segnale dei recettori per i fattori di crescita 150
- Approcci farmacologici al controllo dell'attività dei recettori per i fattori di crescita 157
- Anticorpi monoclonali 158
- Inibitori delle tirosina chinasi 158
- I recettori per fattori di crescita come bersaglio di farmaci antitumorali 159
- Bibliografia essenziale 160

CAPITOLO 15

I recettori per le citochine 161

Massimo Locati

- Classificazione delle citochine e dei loro recettori... 161
- Recettori ematopoietici 161
- Recettori ad attività tirosinchinasica 162
- Recettori della famiglia di IL-1/IL-18-R 163
- Recettori della famiglia di TNF R 164
- Recettori per chemochine 165
- Le citochine nel contesto biologico 165
- Citochine ematopoietiche 166
- Citochine dell'immunità innata 167
- Citochine dell'immunità acquisita 169
- Citochine antinfiammatorie e immunosoppressive... 170
- Farmacologia delle citochine e dei loro recettori... 171
- Inibitori recettoriali 171
- Inibitori della trasduzione del segnale 171
- Modulatori della produzione di citochine 172
- Anticorpi terapeutici contro citochine e loro recettori 172
- Bibliografia essenziale 172

CAPITOLO 16

I recettori che mediano l'adesione cellulare... 173

Giorgio Berton, Carlo Laudanna

- I recettori di adesione 173
- Trasduzione di segnali all'interno della cellula 177

Terapie anti-adesive.....	179
Bibliografia essenziale.....	182

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 16

16.1 Interazioni adesive e attivazione piastrinica Giorgio Berton, Carlo Laudanna	
16.2 Interazioni adesive e reclutamento leucocitario Giorgio Berton, Carlo Laudanna	
16.3 Trasduzione del segnale da parte di chinasi FAK e Src Giorgio Berton, Carlo Laudanna	

CAPITOLO 17

I recettori solubili e gli anticorpi monoclonali diretti contro agonisti e recettori	183
Alberto Mantovani	
Recettori solubili.....	183
Anticorpi monoclonali.....	187
Bibliografia essenziale.....	188

SEZIONE 4

Le cellule come farmaci

CAPITOLO 18

Medicina rigenerativa e terapia genica	191
Luciano Conti, Elena Cattaneo	
Principi di medicina rigenerativa.....	191
Definizione e principali tipologie di cellule staminali.....	192
Cellule staminali pluripotenti.....	193
Cellule staminali multipotenti o adulte.....	194
Prodotti medicinali a base di cellule staminali.....	195
Applicazioni della terapia cellulare e della medicina rigenerativa.....	195
Terapia genica.....	198
Tipologie di protocolli di terapia genica.....	199
Applicazioni della terapia genica.....	200
Terapia genica delle malattie ereditarie monogeniche.....	200
Prospettive future.....	202
Bibliografia essenziale.....	202

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 18

18.1 Storia e sviluppi della ricerca sulle cellule iPS Luciano Conti, Elena Cattaneo	
18.2 Linee guida per la messa a punto di medicinali a base di cellule Luciano Conti, Elena Cattaneo	
18.3 Utilizzo delle cellule staminali ematopoietiche per la cura di malattie del sangue Luciano Conti, Elena Cattaneo	
18.4 Preparazione di vettori virali sicuri per la terapia genica delle cellule somatiche Luciano Conti, Elena Cattaneo	

18.5 Terapia genica della fibrosi cistica e dei tumori Luciano Conti, Elena Cattaneo	
--	--

SEZIONE 5

Modulazione dell'espressione genica

CAPITOLO 19

Farmacologia della trascrizione genica e farmacoepigénomica	205
Diego Fornasari, Roberta Benfante	
Introduzione ai meccanismi di regolazione della trascrizione.....	205
Trascrizione inducibile da stimoli extracellulari ...	212
Dalla farmacologia della trascrizione alla farmacoepigénomica.....	214
Bibliografia essenziale.....	217

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 19

19.1 Farmacoepigénomica Diego Fornasari, Roberta Benfante	
---	--

CAPITOLO 20

I recettori intracellulari	219
Adriana Maggi, Elisabetta Vegeto	
Caratteristiche strutturali dei recettori intracellulari	219
Classificazione dei recettori.....	219
Organizzazione molecolare dei domini funzionali ..	220
Recettori intracellulari come fattori di trascrizione regolati da ligandi.....	220
Classificazione dei ligandi.....	222
Classi dei ligandi per i recettori intracellulari.....	222
Attività extra-nucleare dei recettori intracellulari ..	225
Attività fisiologiche e controllo farmacologico dei recettori intracellulari.....	225
Agonisti e antagonisti recettoriali.....	227
I recettori CAR e SXR.....	231
Bibliografia essenziale.....	232

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 20

20.1 I ligandi dei recettori intracellulari Adriana Maggi, Elisabetta Vegeto	
--	--

CAPITOLO 21

Farmacologia degli RNA	233
Valerio Fulci, Giuseppe Macino	
Strategie per l'uso dell'RNA come farmaco.....	233
RNA interference.....	234
Inibizione dell'attività biologica di miRNA tramite oligonucleotidi complementari.....	235
Oligonucleotidi antisense come strumento per modificare i pattern di splicing.....	236
Aptameri.....	236
Veicolazione.....	237

Struttura chimica generale.....	238
Farmacotossicologia.....	239
Farmacologia cellulare.....	240
Tossicità e mutagenicità.....	240
Farmacocinetica e tossicologia sistemica.....	240
Applicazioni correnti e prospettive future.....	240
Bibliografia essenziale.....	241

SEZIONE 6

Controllo farmacologico del trasporto
attraverso le membrane cellulari

CAPITOLO 22

I canali ionici.....	245
----------------------	-----

Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke

Caratterizzazione e funzione dei canali ionici.....	246
Organizzazione strutturale dei canali ionici.....	249
Farmaci e canali ionici.....	253
Canali al sodio.....	254
Canali al calcio.....	258
Canali al potassio.....	265
Sottofamiglie di canali al K ⁺ a 2 segmenti transmembrana (2 TM).....	265
Sottofamiglie di canali a 6 TM.....	269
Altre famiglie a 6 o 7 TM: i canali al K ⁺ Ca ²⁺ -dipendenti.....	272
Canali non selettivi, anionici e altri.....	273
Canali cationici modulati dai nucleotidi ciclici.....	273
Bibliografia essenziale.....	276

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 22

22.1 Come si osservano in tempo reale i canali e le loro correnti Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.2 Modalità di valutazione dell'interazione tra farmaci e canali ionici Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.3 Tossine peptidiche naturali Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.4 Fisiopatologia e farmacologia della contrazione muscolare Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.5 Fisiopatologia dei canali del Ca ²⁺ voltaggio- dipendenti: studi di genetica animale e umana Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.6 La sindrome del QT lungo indotta da farmaci Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.7 Canali ionici TRP Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.8 Canali del sodio non voltaggio-dipendenti epiteliali (ENaC) e sensibili all'acido (ASIC) Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.9 Canali per anioni Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.10 Canali per l'acqua: le acquaporine Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	

22.11 Canali del Ca ²⁺ voltaggio-indipendenti attivati dalla deplezione dei depositi del reticolo endoplasmatico Maurizio Tagliatalata, Enzo Wanke	
22.12 Modulazione farmacologica delle giunzioni comunicanti e delle sinapsi elettriche Francesco Clementi	

CAPITOLO 23

I trasportatori di membrana.....	277
----------------------------------	-----

Lucio Annunziato, Giuseppe Pignataro, Gianfranco Di Renzo

Trasportatori ATP-dipendenti.....	277
Trasportatori ATP-indipendenti.....	278
Na ⁺ /K ⁺ ATPasi.....	279
Struttura.....	279
Proprietà biofisiche.....	280
Trasduzione del segnale.....	280
Farmaci attivi sulla Na ⁺ /K ⁺ ATPasi.....	281
H ⁺ /K ⁺ ATPasi.....	281
Struttura.....	281
Distribuzione.....	282
Elettrofisiologia e proprietà biofisiche.....	282
Regolazione.....	282
Farmaci.....	283
Ca ²⁺ ATPasi della membrana plasmatica.....	283
Farmaci.....	284
ER Ca ²⁺ ATPasi.....	284
Struttura.....	284
Distribuzione tissutale e cellulare.....	284
Meccanismi regolatori e proprietà fisiologiche.....	285
Modulazione farmacologica.....	285
Scambiatore Na ⁺ /Ca ²⁺	285
Struttura.....	286
Distribuzione tissutale e cellulare.....	287
Proprietà biofisiche ed elettrofisiologiche.....	287
Fisiologia.....	287
Fisiopatologia.....	287
Farmaci in grado di modulare l'attività di NCX.....	288
Scambiatore Na ⁺ /H ⁺	288
Struttura.....	289
Distribuzione cellulare e tissutale.....	289
Proprietà biofisiche ed elettrofisiologiche.....	289
Meccanismi regolatori e proprietà fisiopatologiche.....	289
Farmaci.....	290
Cotrasportatore Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻	290
Struttura.....	290
Distribuzione tissutale e cellulare.....	290
Proprietà elettrofisiologiche e regolazione.....	291
Fisiologia.....	291
Fisiopatologia.....	291
Farmaci.....	291
Bibliografia essenziale.....	292

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 23

23.1 I sistemi di estrusione dei farmaci Lucio Annunziato, Giuseppe Pignataro, Gianfranco Di Renzo	
---	--

- 23.2** I glicosidi cardioattivi
Lucio Annunziato, Giuseppe Pignataro, Gianfranco Di Renzo
- 23.3** Farmaci diuretici
Lucio Annunziato, Giuseppe Pignataro, Gianfranco Di Renzo
- 23.4** Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ come nuovo bersaglio molecolare per lo sviluppo di farmaci utili per il trattamento dell'ischemia cerebrale
Lucio Annunziato, Giuseppe Pignataro, Gianfranco Di Renzo

CAPITOLO 24**I neurotrasportatori** 293**Gaetano Di Chiara**

- Ruolo dei trasportatori nella funzionalità sinaptica . . . 293
- Regolazione dell'attività e del traffico
dei neurotrasportatori 294
- I neurotrasportatori per i neurotrasmettitori** 294
- Trasportatori della membrana plasmatica
 Na^+/K^+ -dipendenti per gli aminoacidi
eccitatori 294
- Trasportatori della membrana plasmatica
 Na^+/Cl^- -dipendenti 297
- Trasportatori vescicolari H^+ -dipendenti 305
- Bibliografia essenziale 308

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 24

- 24.1** Prospettive terapeutiche della stimolazione del trasporto dell'acido glutammico
Gaetano Di Chiara
- 24.2** Proprietà terapeutiche degli inibitori dei trasportatori del GABA
Gaetano Di Chiara
- 24.3** Gli inibitori dei neurotrasportatori delle ammine e i farmaci antidepressivi
Gaetano Di Chiara
- 24.4** Meccanismo d'azione dell'amfetamina
Gaetano Di Chiara

SEZIONE 7**Controllo della proteolisi****CAPITOLO 25****La proteolisi intracellulare** 311**Fabio Di Lisa, Edon Melloni**

- Caratteristiche generali delle proteasi 311
- Classificazione 311
- Caratteristiche e regolazione della proteolisi intracellulare 313
- Funzioni e modulazione farmacologica dei principali sistemi proteolitici intracellulari 314
- Proteasi lisosomiali 314
- Proteasi compartimentalizzate con funzioni specifiche 317
- Proteasi citoplasmatiche 319
- Proteasi intracellulari esogene 324
- Bibliografia essenziale 326

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 25

- 25.1** Terminologia delle proteasi
Fabio Di Lisa, Edon Melloni
- 25.2** L'autofagia
Fabio Di Lisa, Edon Melloni
- 25.3** Inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina e loro azione nelle patologie cardiovascolari
Francesco Clementi, Guido Fumagalli
- 25.4** Ubiquitina e proteasoma
Fabio Di Lisa, Edon Melloni

CAPITOLO 26**La proteolisi extracellulare** 327**Francesco Blasi**

- Sistemi di degradazione proteolitica della matrice extracellulare 327
- Il sistema del plasminogeno e i suoi attivatori 328
- Le metalloproteasi della matrice 330
- Bibliografia essenziale 332

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 26

- 26.1** Attivatori del plasminogeno e malignità tumorale
Francesco Blasi
- 26.2** Attivatori del pasminogeno e malattie cardiovascolari
Francesco Blasi
- 26.3** uPAR, cancro e cellule staminali
Francesco Blasi

SEZIONE 8**Controllo del ciclo e proliferazione cellulare****CAPITOLO 27****Ciclo cellulare e morte cellulare** 335**Angelo Spinedi, Orazio Cantoni, Francesco Autuori, Mauro Piacentini**

- Il ciclo cellulare 335
- La morte cellulare 338
- La morte cellulare programmata o apoptosi 338
- Apoptosi e ciclo cellulare 343
- Farmaci, ciclo cellulare e apoptosi 344
- La necrosi 344
- Bibliografia essenziale 346

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 27

- 27.1** P53: regolatore della progressione del ciclo mitotico e induttore di apoptosi
Angelo Spinedi, Orazio Cantoni, Francesco Autuori, Mauro Piacentini
- 27.2** Catastrofe mitotica
Angelo Spinedi, Orazio Cantoni, Francesco Autuori, Mauro Piacentini
- 27.3** Via intrinseca di morte cellulare indotta dal reticolo endoplasmatico
Angelo Spinedi, Orazio Cantoni, Francesco Autuori, Mauro Piacentini
- 27.4** Farmaci e apoptosi
Angelo Spinedi, Orazio Cantoni, Francesco Autuori, Mauro Piacentini

CAPITOLO 28

Meccanismo d'azione dei farmaci antitumorali

Giovanni Luca Beretta, Laura Gatti, Paola Perego	
Farmaci antitumorali convenzionali	348
Agenti alchilanti	348
Composti del platino	348
Antimetaboliti	349
Farmaci che agiscono sui microtubuli	351
Le DNA topoisomerasi come bersagli di farmaci antitumorali	351
Farmaci antitumorali bersaglio-specifici	354
Inibitori di fattori di sopravvivenza	354
Inibitori del proteasoma	356
Fattori epigenetici quali bersaglio farmacologico	357
Telomeri e telomerasi quali potenziali bersagli	357
Anticorpi monoclonali in uso clinico	358
La farmacoresistenza agli agenti antitumorali	360
Bibliografia essenziale	360

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 28

- 28.1** Meccanismi di resistenza ai farmaci antitumorali
Giovanni Luca Beretta, Laura Gatti, Paola Perego

SEZIONE 9

Controllo del metabolismo cellulare

CAPITOLO 29

Il controllo farmacologico dello stress ossidativo e dei mitocondri

Orazio Cantoni, Clara De Palma, Fabio Di Lisa	
Struttura e organizzazione del mitocondrio	363
Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)	364
Formazione mitocondriale delle specie reattive dell'ossigeno	364
Ruolo fisiologico delle ROS	
nella trasduzione del segnale intracellulare	367
Il ruolo patologico delle ROS	
nella disfunzione e nella morte cellulare	367
Il ruolo fisiopatologico dell'omeostasi mitocondriale del Ca^{2+}	368
Il poro della transizione della permeabilità mitocondriale	369
Effetti di alcuni farmaci a livello mitocondriale	371
Bibliografia essenziale	372

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 29

- 29.1** Ruolo della dinamica mitocondriale nella fisiopatologia cellulare
Clara De Palma, Orazio Cantoni, Fabio Di Lisa
- 29.2** Ruolo dei mitocondri nel danno ischemico del miocardio
Clara De Palma, Orazio Cantoni, Fabio Di Lisa

CAPITOLO 30

Il controllo farmacologico della sintesi dei lipidi

Lorenzo Arnaboldi, Alberto Corsini, Nicola Ferri	
Biosintesi del colesterolo	374
Le statine: inibitori della HMG-CoA reduttasi	374
Inibitori della farnesil-PP sintetasi (nitro-bifosfonati)	375
Inibitori della squalene sintetasi	375
Biosintesi degli acidi grassi	376
Sintetasi degli acidi grassi e sua inibizione	377
Desaturasi degli acidi grassi e suoi inibitori	377
Biosintesi dei trigliceridi	378
Inibitori della diacilglicerolo aciltrasferasi (DGAT)	378
Regolatori della trascrizione genica di geni coinvolti nel metabolismo lipidico	379
I recettori LXR e i ligandi sintetici di LXR	379
I recettori PPAR e la loro modulazione farmacologica	379
PPAR α agonisti: i fibrati	380
PPAR γ agonisti: tiazolidinedioni	380
Agonisti doppi PPAR α/γ	380
Proteine di trasferimento dei lipidi	381
Acil-coenzima A-colesterolo aciltrasferasi e suoi inibitori	381
Proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) e suoi inibitori	382
La proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi (MTP) e suoi inibitori	383
Bibliografia essenziale	384

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 30

- 30.1** Farmacologia della via biosintetica del mevalonato
Lorenzo Arnaboldi, Alberto Corsini, Nicola Ferri
- 30.2** Farmacologia della biosintesi degli acidi grassi
Lorenzo Arnaboldi, Alberto Corsini, Nicola Ferri
- 30.3** Farmacologia della biosintesi dei trigliceridi
Lorenzo Arnaboldi, Alberto Corsini, Nicola Ferri
- 30.4** Ruolo dei recettori LXR sul metabolismo lipidico e interventi farmacologici
Lorenzo Arnaboldi, Alberto Corsini, Nicola Ferri
- 30.5** Le lipoproteine
Lorenzo Arnaboldi, Alberto Corsini, Nicola Ferri
- 30.6** Proteine di trasferimento dei lipidi
Lorenzo Arnaboldi, Alberto Corsini, Nicola Ferri

CAPITOLO 31

Il controllo farmacologico del metabolismo glucidico

Paolo Moghetti, Giacomo Zoppini	
Il controllo della glicemia	385
Il trasporto del glucosio	386
Il sistema dell'insulina	387
Il recettore per l'insulina e il suo sistema di trasduzione	390

Farmacologia del controllo glicemico	391
Modulazione farmacologica della funzionalità delle cellule β	391
Sistema delle incretine	392
Modulazione del signalling insulinico	392
Modulazione dell'assorbimento intestinale del glucosio	393
Insulinoreistenza e infiammazione cronica: un nuovo possibile target terapeutico	393
Bibliografia essenziale	394

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 31

- 31.1** Il sistema degli ormoni controinsulari
Paolo Moghetti, Giacomo Zoppini

SEZIONE 10

La comunicazione intercellulare

CAPITOLO 32

Il controllo farmacologico della funzione sinaptica..... 397

Michela Matteoli, Elisabetta Menna, Claudia Verderio

La sinapsi	397
Caratteristiche generali	397
La sinapsi tripartita	398
La complessità dell'organizzazione sinaptica e le sinaptopatie	399
La secrezione del neurotrasmettitore	400
I messaggeri chimici: neurotrasmettitori, neuropeptidi	400
Le vescicole sinaptiche	401
Ciclo di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche ..	402
Il destino del neurotrasmettitore	404
La ricezione del segnale: il compartimento postsinaptico	404
Formazione, mantenimento e plasticità della sinapsi	405
Farmacologia della neurosecrezione	407
Bibliografia essenziale	410

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 32

- 32.1** Ruolo degli astrociti nella trasmissione sinaptica
Michela Matteoli, Elisabetta Menna, Claudia Verderio
- 32.2** Organizzazione dinamica dei pool di vescicole sinaptiche
Michela Matteoli, Elisabetta Menna, Claudia Verderio
- 32.3** Processo di endocitosi delle vescicole sinaptiche
Michela Matteoli, Elisabetta Menna, Claudia Verderio
- 32.4** Secrezione dei neuropeptidi
Michela Matteoli, Elisabetta Menna, Claudia Verderio
- 32.5** Ruolo dei lipidi nella regolazione del ciclo di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche
Michela Matteoli, Elisabetta Menna, Claudia Verderio

CAPITOLO 33

La trasmissione catecolaminergica

Sandra Sigala, Maurizio Memo, M. Cristina Missale,
Pier Franco Spano

Distribuzione e funzioni dei sistemi catecolaminergici nel sistema nervoso autonomo	411
Neurotrasmettitori del sistema nervoso autonomo ..	412
Organizzazione anatomica del sistema simpatico ..	412
Distribuzione e funzioni dei sistemi catecolaminergici nel SNC	414
Sistemi noradrenergici	414
Sistemi dopaminergici	415
Sintesi delle catecolamine	417
Immagazzinamento vescicolare e rilascio di catecolamine	418
Simpaticomimetici indiretti	418
Spegnimento del segnale catecolaminergico	418
Recettori per le catecolamine	420
Recettori adrenergici	420
Recettori dopaminergici	423
Principi di intervento farmacologico sui recettori adrenergici	424
Farmaci attivi sui recettori α -adrenergici	424
Farmaci attivi sui recettori β -adrenergici	424
Farmaci attivi sui recettori dopaminergici	427
Bibliografia essenziale	428

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 33

- 33.1** Dopamina e morbo di Parkinson
Sandra Sigala, Maurizio Memo, M. Cristina Missale,
Pier Franco Spano
- 33.2** Sistema cerebrale della gratificazione
Sandra Sigala, Maurizio Memo, M. Cristina Missale,
Pier Franco Spano
- 33.3** Modulazione delle proprietà funzionali dei recettori dopaminergici per interazione con altre proteine
Sandra Sigala, Maurizio Memo, M. Cristina Missale,
Pier Franco Spano

CAPITOLO 34

La trasmissione colinergica

Giancarlo Pepeu

Distribuzione e funzioni dei sistemi colinergici	429
Trasmissione colinergica nel sistema nervoso periferico	430
Il sistema colinergico non neuronale	430
Trasmissione colinergica nel sistema nervoso centrale	430
Sintesi e metabolismo dell'acetilcolina	431
Accumulo intracellulare e rilascio dell'acetilcolina	433
Recettori colinergici	434
Recettori nicotinici	434
Recettori muscarinici	436

Farmaci attivi sui recettori colinergici.....	436
Farmaci attivi sui recettori nicotinici.....	436
Farmaci attivi sui recettori muscarinici.....	437
Bibliografia essenziale.....	438

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 34

34.1 Metodi di studio del ruolo del sistema colinergico cerebrale nei processi cognitivi Giancarlo Pepeu	
34.2 Colinesterasi e inibitori Giancarlo Pepeu	
34.3 I bloccanti neuromuscolari Giancarlo Pepeu	
34.4 Principali interventi farmacologici sul sistema colinergico Giancarlo Pepeu	

CAPITOLO 35

La trasmissione serotoninergica..... 439

Maurizio Popoli, Laura Musazzi, Giorgio Racagni

Funzioni e distribuzione del sistema serotoninergico.....	439
Sintesi e metabolismo della serotonina.....	443
Liberazione di 5-HT e inattivazione del segnale serotoninergico.....	444
Classificazione dei recettori serotoninergici.....	445
Farmaci attivi sui recettori serotoninergici.....	446
Bibliografia essenziale.....	448

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 35

35.1 Farmaci che agiscono sul sistema serotoninergico Maurizio Popoli, Laura Musazzi, Giorgio Racagni	
35.2 Sistema serotoninergico e modulazione della percezione del dolore Maurizio Popoli, Laura Musazzi, Giorgio Racagni	
35.3 Melatonina, 5-HT e regolazione dei ritmi circadiani Maurizio Popoli, Laura Musazzi, Giorgio Racagni	

CAPITOLO 36

La trasmissione istaminergica..... 449

Emanuela Masini

Distribuzione e funzioni del sistema istaminergico.....	449
Sintesi e metabolismo dell'istamina.....	454
Recettori istaminergici e loro modulazione farmacologica.....	455
Farmaci attivi sui recettori istaminergici.....	455
Principali interventi farmacologici sul sistema istaminergico.....	456
Bibliografia essenziale.....	458

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 36

36.1 I recettori istaminergici e le loro vie di trasduzione del segnale Emanuela Masini	
---	--

CAPITOLO 37

La trasmissione GABAergica..... 459

Mariangela Serra, Enrico Sanna, Giovanni Biggio

Distribuzione, sintesi e metabolismo del GABA.....	459
Liberazione e ricaptazione del GABA.....	461
Recettori per il GABA.....	461
Recettori GABA _A	461
Recettori GABA _A extrasinaptici.....	464
Farmacologia della trasmissione GABAergica.....	465
Recettori GABA _B	469
Farmacologia dei recettori GABA _B	471
Riassunto schematico dei principali interventi farmacologici sulle sinapsi GABAergiche.....	471
Bibliografia essenziale.....	472

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 37

37.1 Farmaci antiepilettici con meccanismo d'azione GABAergico Mariangela Serra, Enrico Sanna, Giovanni Biggio	
37.2 Modulazione fisiologica e farmacologica dell'espressione genica del recettore GABA _A Mariangela Serra, Enrico Sanna, Giovanni Biggio	

CAPITOLO 38

La neurotrasmissione mediata da aminoacidi eccitatori..... 473

Flavio Moroni

Sintesi e metabolismo del glutammato.....	473
Accumulo vescicolare del glutammato, trasporto e spegnimento del segnale.....	474
Recettori per il glutammato.....	476
Recettori ionotropi.....	476
Recettori metabotropi.....	479
Ruolo del sistema glutammatergico in fisiologia e patologia: effetto di farmaci e tossici.....	481
Bibliografia essenziale.....	484

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 38

38.1 Plasticità sinaptica: il potenziamento e l'inibizione sinaptica di lunga durata (LTP e LTD) Flavio Moroni	
--	--

CAPITOLO 39

La trasmissione purinergica..... 485

Stefania Ceruti, Flaminio Cattabeni, Maria Pia Abbraccio

Fonti, metabolismo e rilascio delle purine.....	486
Recettori per le purine.....	488
Recettori P1 per adenosina.....	488
Recettori P2 per ATP.....	489
Ruoli biologici delle purine.....	492
Effetti sul sistema cardiovascolare.....	492
Effetti sul sistema nervoso centrale e periferico.....	493
Effetti sul sistema respiratorio.....	494
Effetti su altri sistemi.....	494

Le purine nella terapia antitumorale	495
Bibliografia essenziale.....	496

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 39

39.1 Purine e ischemia Stefania Ceruti, Flaminio Cattabeni, Maria Pia Abbraccio	
39.2 Farmaci attivi sul sistema purinergico attualmente in sviluppo Stefania Ceruti, Flaminio Cattabeni, Maria Pia Abbraccio	

CAPITOLO 40

I neuropeptidi.....	497
Lucia Negri, Roberta Lattanzi	
Caratteristiche dei neuropeptidi	497
Trasmissione peptidergica	498
Sintesi dei neuropeptidi.....	498
Trasformazione del pro-peptide	499
Come si accende e si spegne il segnale peptidergico	501
Significato funzionale e potenzialità terapeutiche ..	501
Bibliografia essenziale.....	504

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 40

40.1 Caratteristiche di alcuni neuropeptidi Lucia Negri, Roberta Lattanzi	
40.2 Ipotalamo e neuropeptidi Lucia Negri, Roberta Lattanzi	
40.3 Neuropeptidi e nocicezione Lucia Negri, Roberta Lattanzi	

CAPITOLO 41

Il sistema oppioide.....	505
Patrizia Romualdi, Sanzio Candeletti	
Peptidi oppioidi endogeni.....	505
Recettori oppioidi	506
Trasduzione del segnale.....	507
Distribuzione dei recettori oppioidi	508
Effetti degli oppioidi.....	508
Modulazione della trasmissione nocicettiva	509
Depressione respiratoria.....	510
Effetti cardiovascolari	510
Effetti sulla motilità viscerale.....	510
Effetti sull'assunzione di cibo e sulla temperatura corporea.....	510
Effetti sul sistema immunitario.....	511
Tolleranza e dipendenza fisica agli oppiacei.....	511
Meccanismi molecolari di adattamento cellulare all'esposizione cronica a oppiacei: desensitizzazione e internalizzazione.....	512
Meccanismi molecolari dell'astinenza	513
Regolazione della trascrizione genica da parte degli oppioidi	513
Meccanismi epigenetici	514
Dipendenza psichica: oppioidi e sistema limbico ..	514
Dipendenza psichica: oppioidi e sistema limbico ..	514
Bibliografia essenziale	516

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 41

41.1 Farmaci oppiacei Patrizia Romualdi, Sanzio Candeletti	
41.2 La nocicettina Patrizia Romualdi, Sanzio Candeletti	
41.3 Distribuzione dei recettori oppioidi Patrizia Romualdi, Sanzio Candeletti	
41.4 Basi neurobiologiche del dolore acuto e cronico Patrizia Romualdi, Sanzio Candeletti	
41.5 La tossicodipendenza da oppiacei Patrizia Romualdi, Sanzio Candeletti	

CAPITOLO 42

Il sistema endocannabinoide.....	517
Daniela Parolaro, Tiziana Rubino	
I recettori per i cannabinoidi.....	517
Recettori CB1.....	517
Recettori CB2.....	518
Recettore GPR55.....	518
Recettore TRPV1	518
Recettori PPAR.....	518
Gli endocannabinoidi.....	518
Anandamide.....	519
2-arachidonoilglicerolo (2-AG).....	519
Il trasportatore.....	520
Funzioni biologiche del sistema degli endocannabinoidi	520
Plasticità mediata dagli endocannabinoidi	520
Altre funzioni biologiche.....	520
Farmacologia del sistema degli endocannabinoidi ..	523
Agonisti diretti.....	523
Antagonisti.....	525
Agonisti indiretti.....	525
Bibliografia essenziale	526

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 42

42.1 Struttura dei farmaci attivi sul sistema endocannabinoide Daniela Parolaro, Tiziana Rubino	
42.2 Il sistema endocannabinoide nella dipendenza dalla <i>Cannabis</i> e da altre sostanze d'abuso Daniela Parolaro, Tiziana Rubino	

CAPITOLO 43

Farmacologia dell'ossido nitrico.....	527
Emilio Clementi, Giacinto Bagetta, Giuseppe Nisticò	
Chimica dell'ossido nitrico.....	527
Biosintesi dell'ossido nitrico.....	528
Biochimica dell'ossido nitrico	531
Meccanismi con i quali NO esplica la sua azione cellulare	531
NO e micro RNA.....	533
Effetti sistemici e d'organo dell'ossido nitrico	534
Effetti a livello dell'apparato cardiovascolare	534
NO e sistema respiratorio	536

NO e malattie metaboliche	536
NO e sistema nervoso centrale e periferico.....	536
NO e apparato muscolare	538
NO e sistema immunitario.....	539
Farmacologia dell'ossido nitrico.....	540
Nitrovasodilatatori tradizionali.....	540
Esteri nitrici di farmaci noti.....	540
Stimolatori dell'azione di cGMP.....	541
Inibitori delle NOS.....	541
Bibliografia essenziale	542

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 43

- 43.1** Scoperta del ruolo biologico dell'ossido nitrico e brevi cenni storici
Emilio Clementi, Giacinto Bagetta, Giuseppe Nisticò
- 43.2** Interazioni dell'ossido nitrico con i componenti dell'organismo
Emilio Clementi, Giacinto Bagetta, Giuseppe Nisticò
- 43.3** Attività catalitica, caratteristiche molecolari e regolazione delle NO sintasi
Emilio Clementi, Giacinto Bagetta, Giuseppe Nisticò
- 43.4** Ossido nitrico e controllo della morte cellulare
Emilio Clementi, Giacinto Bagetta, Giuseppe Nisticò
- 43.5** Ruolo dell'ossido nitrico nell'infiammazione e nella patologia tumorale
Emilio Clementi, Giacinto Bagetta, Giuseppe Nisticò

CAPITOLO 44

La cascata dell'acido arachidonico

Carlo Patrono, Paola Patrignani

Liberazione dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana.....	543
Metabolismo enzimatico dell'acido arachidonico ...	544
La via della PGH sintasi.....	544
Metabolismo degli endoperossidi ciclici	548
La via delle lipossigenasi	550
Metabolismo dell'LTA ₄	551
Metabolismo transcellulare di PGH ₂ ed LTA ₄	552
Metabolismo non enzimatico dell'acido arachidonico.....	552
Recettori per gli eicosanoidi.....	552
Recettori dei prostanoidei	553
Recettori dei leucotrieni.....	555
Bibliografia essenziale	556

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 44

- 44.1** Meccanismo d'azione dell'aspirina come farmaco antitrombotico
Carlo Patrono, Paola Patrignani

SEZIONE 11

Modulazione farmacologica dei processi di difesa

CAPITOLO 45

Modulazione farmacologica del sistema immunitario

Carlo Riccardi, Graziella Migliorati

La risposta immunitaria.....	559
Il concetto di autoimmunità	560
Farmaci immunosoppressori.....	560
Chemioterapici antitumorali.....	560
Farmaci immunosoppressori più specifici.....	562
Inibitori della calcineurina.....	563
Rapamicina.....	566
Corticosteroidi.....	567
Anticorpi come immunosoppressori selettivi	569
Altri farmaci biologici con attività immunomodulante.....	570
Problemi legati all'uso di anticorpi.....	570
Farmaci immunostimolanti.....	571
Prodotti di derivazione microbica, estratti timici e composti chimicamente definiti	571
Le citochine	572
Nuovi bersagli molecolari nella terapia immunosoppressiva	574
Inibitori delle fosfodiesterasi 4 e delle p38 MAP chinasi	574
Bibliografia essenziale	574

CAPITOLO 46

Meccanismi d'azione dei farmaci antifettivi ..

Francesco Scaglione

Farmaci antibatterici	575
Meccanismi d'azione dei farmaci antibatterici	577
Meccanismi di resistenza ai farmaci antibatterici ...	584
Farmaci antifungini	585
Meccanismi d'azione dei farmaci antifungini	585
Meccanismi di resistenza ai farmaci antifungini....	587
Farmaci antivirali	588
Meccanismi d'azione dei farmaci antivirali.....	588
Farmaci attivi contro il virus dell'influenza.....	590
Farmaci attivi contro i virus dell'epatite	590
Farmaci attivi contro l'HIV	592
Bibliografia essenziale	594

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 46

- 46.1** Meccanismi di resistenza ai farmaci antibatterici
Francesco Scaglione

CAPITOLO 47

Strategie farmacologiche nell'infiammazione.....

Salvatore Cuzzocrea, Maria Antonietta Catania

Induttori e sensori di infiammazione.....	596
Induttori microbici.....	596

Induttori non microbici	597
Mediatori ed effettori dell'infiammazione.....	599
Strategie farmacologiche per il trattamento dell'infiammazione.....	602
Bibliografia essenziale	604

SEZIONE 12

Personalizzazione della terapia

CAPITOLO 48

Evoluzione dello studio della farmacocinetica nel processo di scoperta di nuovi farmaci ...	607
--	------------

Simone Braggio, Mario Pellegatti

Ruolo della farmacocinetica nella scoperta di nuovi farmaci	607
Farmacocinetica e metabolismo nelle prime fasi di ricerca.....	608
Parametri chimico-fisici e caratteristiche farmacocinetiche.....	609
Studi di permeabilità in vitro	609
Studi di stabilità metabolica in vitro	609
Studi di inibizione degli enzimi metabolizzanti in vitro.....	610
Studi di legame alle proteine in vitro.....	610
Studi preliminari di farmacocinetica in vivo.....	610
Strategie per aumentare la biodisponibilità orale...	610
Strategie per ottimizzare l'emivita.....	611
Farmacocinetica come scienza traslazionale.....	611
Farmacocinetica e metabolismo nelle fasi di sviluppo.....	612
Studi con l'uso di molecole radioattive	612
Ruolo della farmacocinetica negli studi di tossicità ..	612
Studio dei metaboliti.....	613
Metaboliti stabili	613
Metaboliti reattivi	613
Farmacocinetica e metabolismo nelle fasi cliniche ..	614
Variabilità farmacocinetica e sue cause	614
Interazioni con altri farmaci	615
Farmacocinetica e formulazione: i farmaci "equivalenti"	615
Sviluppi futuri della disciplina di farmacocinetica e metabolismo	615
Bibliografia essenziale	616

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 48

48.1 Bioanalitica come pietra angolare della farmacocinetica: la spettrometria di massa	
Simone Braggio, Mario Pellegatti	

CAPITOLO 49

Basi cellulari della farmacocinetica	617
---	------------

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

Rapido viaggio con il farmaco nell'organismo	617
Passaggio dei farmaci attraverso le membrane cellulari	619

Diffusione passiva attraverso membrane cellulari ..	619
Trasporto di farmaci attraverso membrane cellulari	620
Trasporto attivo contro gradiente elettrochimico ...	622
Trasportatori e diffusione facilitata.....	622
Passaggio attraverso canali di membrana	623
Diffusione dei farmaci a organi e tessuti.....	623
Caratteristiche delle principali barriere cellulari...	624
Bibliografia essenziale	627

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 49

49.1 Approccio integrato alla farmacocinetica	
Riccardo Fesce	

CAPITOLO 50

Assorbimento e vie di somministrazione dei farmaci	629
---	------------

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

Regole generali sulla velocità di assorbimento dei farmaci.....	630
Vie enterali.....	631
Via orale	631
Via buccale e rettale	634
Vie parenterali sistemiche.....	634
Via intravascolare	634
Via intramuscolare	635
Via cutanea.....	635
Altre vie.....	636
Via inalatoria	636
Applicazioni topico-regionali	637
Vie intracavitari	637
Via dermica o transcutanea	637
Vie mucosali.....	638
Cinetiche di assorbimento	638
Drug delivery. Formulazioni per regolare tempi e sedi del rilascio del farmaco	642
Bibliografia essenziale	644

CAPITOLO 51

Distribuzione ed eliminazione dei farmaci	645
--	------------

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

Distribuzione.....	645
Il volume apparente di distribuzione.....	646
Il legame dei farmaci alle proteine plasmatiche ...	648
Eliminazione.....	652
Concetto di emivita.....	653
Concetto di clearance.....	654
Escrezione renale dei farmaci	655
Escrezione epatica e circolo entero-epatico.....	659
Rapporto tra metabolismo ed escrezione.....	661
Bibliografia essenziale	662

CAPITOLO 52

Il metabolismo dei farmaci 663

Enzo Chiesara, Laura Marabini, Sonia Radice

Reazioni enzimatiche di fase I	664
Ossidazioni	664
Riduzioni	667
Idrolisi	667
Reazioni enzimatiche di fase II	668
Glicuronoconiugazioni	668
Solfatazioni	669
Metilazioni	669
Acetilazioni	669
Coniugazioni con amminoacidi	670
Coniugazioni con glutazione	670
Biotrasformazioni extraepatiche	670
Induzione e inibizione farmaco-metabolica	671
Induzione del metabolismo dei farmaci	671
Inibizione del metabolismo dei farmaci	672
Bibliografia essenziale	674

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 52

- 52.1** Fattori che possono modificare il metabolismo dei farmaci
Enzo Chiesara, Laura Marabini, Sonia Radice
- 52.2** Induzione farmaco-metabolica
Enzo Chiesara, Laura Marabini, Sonia Radice
- 52.3** Modulazioni di efficacia dovute all'interazione tra farmaci di sintesi e farmaci di origine vegetale
Enzo Chiesara, Laura Marabini, Sonia Radice

CAPITOLO 53

Controllo della concentrazione plasmatica dei farmaci 675

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

Andamento temporale della concentrazione plasmatica dei farmaci dopo singola somministrazione	675
Andamento temporale della concentrazione plasmatica dei farmaci a seguito di somministrazioni ripetute	679
Cinetiche di equilibrio tra più compartimenti	685
La distribuzione dei farmaci somministrati per inalazione	687
Correzioni del regime terapeutico	689
Variazioni del dosaggio in funzione del peso corporeo e costituzione fisica	690
Variazioni del dosaggio in funzione dell'età	690
Correzioni del dosaggio nel corso di patologie epatiche	691
Correzioni del dosaggio in corso di patologie renali	693
Bibliografia essenziale	694

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 53

- 53.1** Monitoraggio terapeutico del farmaco
Dario Cattaneo

CAPITOLO 54

Farmacogenetica e personalizzazione della terapia 695

Diego Fornasari

Le basi genetiche della risposta individuale ai farmaci	695
Polimorfismi genetici e metabolismo dei farmaci	696
Polimorfismi genetici nei geni codificanti per gli enzimi di fase I	697
Polimorfismi genetici nei geni codificanti per gli enzimi di fase II	700
Polimorfismi genetici nei geni codificanti trasportatori coinvolti nell'assorbimento, nella distribuzione e nell'eliminazione dei farmaci	702
Polimorfismi genetici nei geni codificanti per i bersagli terapeutici primari dell'azione dei farmaci	703
Modalità di studio in farmacogenetica	704
Il futuro della farmacogenetica	705
Bibliografia essenziale	706

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 54

- 54.1** Polimorfismi genetici
Diego Fornasari

CAPITOLO 55

Interazioni tra farmaci 707

Achille P. Caputi, Giuseppina Fava, Angela De Sarro

Interazioni farmacocinetiche	708
Interazioni in fase di assorbimento	708
Interazioni in fase di distribuzione	709
Interazioni in fase di biotrasformazione	709
Interazioni in fase di escrezione	712
Interazioni farmacodinamiche	712
Antagonismo chimico	713
Antidotismo	713
Interazioni farmaceutiche o incompatibilità	713
Interazioni rimedi erboristici-farmaci	713
Interazioni farmaci-alimenti	713
Bibliografia essenziale	714

APPROFONDIMENTI CAPITOLO 55

- 55.1** La glicoproteina P e i trasportatori di anioni e cationi coinvolti nelle interazioni tra farmaci
Achille Caputi, Giuseppina Fava, Angela De Sarro
- 55.2** Interazioni tra farmaci e alimenti
Achille Caputi, Giuseppina Fava, Angela De Sarro

SEZIONE

1

Introduzione alla farmacologia

CAPITOLO 1

Principi di farmacologia

Francesco Clementi, Guido Fumagalli

CAPITOLO 2

Breve storia della farmacologia

Vittorio A. Sironi

CAPITOLO 3

Ricerca preclinica e sviluppo di nuovi farmaci

Ennio Ongini

CAPITOLO 4

Metodologia della sperimentazione clinica dei farmaci

Carlo Patrono

1

Principi di farmacologia

Francesco Clementi, Guido Fumagalli

Obiettivi formativi

- ▶ Capire gli ambiti sperimentali e clinici nei quali interviene la farmacologia e il suo apporto ai recenti cambiamenti sociali
- ▶ Distinguere i vari tipi di sostanze e di interventi responsabili di un'azione farmacologica
- ▶ Acquisire familiarità con il lessico farmacologico
- ▶ Orientarsi nelle interazioni tra farmaci e organismo

La farmacologia studia i farmaci e le interazioni che hanno luogo tra questi e gli organismi viventi. Per farmaco si intende ogni sostanza capace di provocare in un organismo modificazioni funzionali mediante un'azione chimica o fisica. Queste modificazioni possono essere sfruttate in modo positivo e portare a risultati utili in terapia o possono, invece, produrre effetti negativi o tossici. Da queste sintetiche definizioni si può subito comprendere quanto sia vasto il campo di studio della farmacologia e come il farmacologo debba possedere conoscenze sia sui composti attivi (la loro struttura chimica e le caratteristiche biofisiche, le metodiche di sintesi e, nel caso di prodotti di estrazione, la loro provenienza), che sull'organismo con il quale interagiscono e sulle patologie che lo affliggono. Come diceva Leonardo da Vinci: "Il medico adopererà bene le medicine quando lui conoscerà che cosa è omo, che cosa è vita e complessione, che cosa è sanità". In questo senso la farmacologia è vicinissima alla fisiologia, in quanto si occupa dei mezzi chimici che modificano le funzioni fisiologiche, è legata alla patologia generale in quanto capace di interpretare le cause chimiche che stanno alla base delle variazioni patologiche, è molto affine alla chimica biologica e alla biologia cellulare e molecolare in quanto utilizza le metodiche di queste discipline e mette a disposizione strumenti (farmaci e molecole) capaci di influire sui diversi processi biologici che caratterizzano la vita della cellula. Essa è infine ponte tra la ricerca di base e la clinica in quanto fornisce i più importanti strumenti terapeutici e, spesso, attraverso di essi, anche una chiave diagnostica e interpretativa delle patologie più complesse.

L'uso dei farmaci ha sostanzialmente cambiato la vita

dell'uomo (vedi Capitolo 2). I progressi nel settore della salute che si sono avuti in questo secolo nei Paesi sviluppati sono sicuramente legati all'aumentato benessere economico che ha portato al miglioramento delle condizioni igieniche, a una più diffusa cultura della prevenzione e della salute, a un'alimentazione più ricca e più armonica, a una vita lavorativa meno pesante, ma certamente gli effetti non sarebbero stati così eclatanti sulla qualità e quantità di vita senza l'aiuto dei farmaci.

I farmaci hanno contribuito non solo alla scomparsa di molte gravi malattie, ma anche a una ridotta ospedalizzazione, a minori danni permanenti da malattie, al controllo di molte patologie gravi e degenerative. Un esempio recente ed eclatante è rappresentato dall'AIDS che, grazie alla messa a punto di farmaci antivirali, si è trasformata nel giro di pochi anni da "peste del secolo" a malattia cronica compatibile con una vita quasi normale per lunghi anni.

Il successo dei farmaci è stato così imponente da far illudere molti che ci possa essere una "pillola" per ogni male. Nascono così anomalie come l'eccessiva medicalizzazione, la scarsa accettazione del fatto che possano ancora esistere malattie non curabili e un'aspettativa eccessiva sui "miracolosi progressi della medicina" che, quando si scontra con la realtà dell'insuccesso, può portare nel pubblico a un senso di sfiducia generalizzato, a irrazionale rifiuto della terapia medica sperimentata e alla fuga verso l'ignoto delle cosiddette "medicine alternative".

La farmacologia ha creato regole severe di sperimentazione preclinica e clinica dei farmaci (vedi Capitoli 3 e 4) che permettono di definire regole per la messa a punto, la scelta e l'uso razionale dei farmaci stessi e di conoscerne

al meglio efficienza terapeutica e tossicità. Queste regole, la cui applicazione ha un elevato costo economico, sono spesso ignorate in altre forme di medicina cosiddetta alternativa. Le pesanti conseguenze di questa ignoranza è che questi approcci "alternativi" non possono garantire una ragionevole probabilità di successo, ma non vengono fornite neanche chiare informazioni sui rischi (tossici e non solo quelli). Inoltre le aziende produttrici di tali preparati non hanno le spese connesse con la ricerca pre-clinica e clinica, che gravano invece sulle aziende farmaceutiche, ottenendo un alto ritorno economico. In realtà l'alternativa maggiore che queste forme di "medicina non ufficiale" offrono alla sperimentazione scientifica dei farmaci sembra essere il clamore, la foga e il successo sui media e qualche risultato aneddottico riportato spesso in assenza di qualunque forma seria di controllo e verifica (vedi CD: Approfondimento I.1. *Terapie alternative o non convenzionali*).

La farmacologia ha inoltre contribuito a modificare molti costumi a livello sia di individuo che di società: si pensi ad esempio al controllo della fertilità e delle emozioni, al potenziamento (più o meno lecito) di alcune prestazioni sia fisiche che mentali, alla diffusione delle patologie da farmaci, il cui esempio più eclatante e negativo è la tossicodipendenza. Le ricadute di tipo economico, e soprattutto etico, che tutto questo comporta, fanno della farmacologia una disciplina scientifica in cui agli aspetti tecnici si associano altrettanto importanti aspetti etici. A chi si addentra, quindi, nello studio della farmacologia si apre un ventaglio di conoscenze multidisciplinari che rendono più vario e interessante il suo cammino culturale attraverso esperimenti complessi e difficili.

Lessico essenziale

Questo libro rappresenta per molti lettori il primo contatto con la farmacologia. Abbiamo ritenuto opportuno raccogliere in modo conciso la terminologia che è propria di questa disciplina e che più frequentemente si incontra in questo testo. La brevità con cui le singole voci sono trattate costringe a semplificazioni e schematismi e si rimanda quindi il lettore interessato ai vari capitoli per un approfondimento sui singoli temi.

Sostanze attive

Farmaco Nell'accezione più ampia, il termine farmaco identifica qualunque sostanza in grado di esercitare un effetto sui sistemi viventi. In tal senso, i farmaci trovano impiego sia in quanto strumenti terapeutici in grado di intervenire su processi patologici che come strumenti sperimentali per la comprensione di eventi biologici. I farmaci sono strumenti sperimentali fondamentali per lo studio e la comprensione di eventi biologici che possono trovare impiego come strumenti terapeutici. Per il medico impegnato nella cura e nella prevenzione delle malattie, il termine farmaco equivale a quello di "medicina" e sta a indicare una sostanza clinicamente utile.

Dal punto di vista storico il termine utilizzato per indicare il farmaco ha subito numerose modificazioni sia concettuali che lessicali. Passiamo dal termine "semplici" utilizzato nel Medio Evo per indicare le erbe medicinali (coltivate nell' "horto dei semplici") nonché sostanze minerali e di origine animale alle quali si attribuivano capacità terapeutiche, al termine "droghe" utilizzato nel Settecento, al termine "sostanza chimica" con cui dal Novecento in poi si indicano i prodotti di estrazione e/o di sintesi. Oggi, con il termine farmaco si intendono anche i prodotti biologici (ad esempio, anticorpi) e le cellule stesse, utilizzate come tali, o modificate mediante tecniche di ingegneria genetica, per produrre farmaci/ormoni in loco oppure per rigenerare o riparare tessuti danneggiati (medicina rigenerativa).

Specialità o preparazione/formulazione farmaceutica Il termine "specialità" indica il nome commerciale con cui un principio attivo è posto in vendita. Tale principio attivo viene confezionato nel modo più adatto alle esigenze di somministrazione e di utilizzo. Ad esempio, uno stesso farmaco può venire preparato/formulato dalla stessa azienda e messo in vendita sotto forma di compresse, fiale, sciroppo, pomata ecc. Nella preparazione il principio attivo è associato con altri componenti (generalmente inerti e chiamati eccipienti). Eventuali differenze nella preparazione farmaceutica non modificano le proprietà farmacologiche del principio attivo, ma possono modificare la farmacocinetica. Di conseguenza, preparati con la stessa quantità di un medesimo principio attivo possono avere effetti clinici diversi per intensità e sviluppo temporale.

La preparazione può essere eseguita in modo industriale, in base alla Farmacopea Ufficiale o secondo le norme approvate dalle autorità competenti. In questo caso essa è denominata "preparazione officinale" o specialità farmaceutica. Quando invece la preparazione viene eseguita dal farmacista (in base alla presentazione di una ricetta medica), essa è denominata "preparazione magistrale".

Farmaci generici o equivalenti Un farmaco/sostanza, quando il brevetto per la sua produzione o per una sua applicazione clinica decade (in genere dopo 15-20 anni), può essere prodotto e venduto liberamente da chiunque, previa autorizzazione da parte delle autorità competenti. Il requisito fondamentale richiesto, oltre alle caratteristiche farmaceutiche di purezza e stabilità, è che il profilo farmacocinetico della nuova formulazione sia sovrapponibile ($\pm 20\%$) a quello del prodotto di riferimento. Il vantaggio per chi acquista il farmaco è che il prezzo è inferiore, non essendo incluse da parte del produttore le spese per la ricerca e lo sviluppo.

Nome dei farmaci I farmaci possono essere indicati con: 1. il nome *chimico*, che ne identifica la composizione chimico-molecolare; 2. il nome *generico o comune* che identifica il farmaco a livello internazionale e in cui l'iniziale del nome è in carattere minuscolo; 3. il nome *commerciale*, che è brevettato e indica la specialità che contiene il farmaco e la cui iniziale è in carattere maiuscolo.

Due esempi:

- nome *chimico*: 1-iso-propilamino-3-(naftilossi) propan-2-olo HCl, nome *comune*: propranololo, nome *commerciale*: Inderal, Tesnol, Bedranol e molti altri.
- nome *chimico*: acido acetilsalicilico, nome *comune*: aspirina, nome *commerciale*: Aspirina, Ascriptin, Cardirene e molti altri.

Droga Nell'uso scientifico il termine indica una miscela di sostanze biologicamente attive presenti in organismi vegetali o animali o le parti di questi organismi che contengono queste sostanze (ad esempio, la droga digitale è costituita dalle foglie di *Digitalis purpurea*). Il termine deriva probabilmente dall'olandese *droog* con cui si indicavano i barili contenenti vegetali e spezie secche importati dalle Indie, dalle quali si estraevano i farmaci. Nel linguaggio comune non farmacologico per droga si intende una sostanza, di origine naturale o ottenuta per sintesi chimica, ad azione psicoattiva assunta per scopi non terapeutici.

Erbe medicinali Le erbe medicinali (o erbe officinali) sono quelle piante che hanno (o si ritiene abbiano) proprietà curative e benefiche. In lingua inglese i preparati da tali erbe vengono definiti "herbal remedies", in parte equivalente al termine "prodotto erboristico".

Molti principi attivi sono contenuti nelle piante, o in parti di esse, o in animali che, un tempo, rappresentavano la fonte unica di principi attivi utilizzabili a scopo terapeutico. Nel corso dei secoli la pratica clinica in Europa e nei Paesi asiatici ha selezionato una serie di "semplici" che, coltivati, trattati e conservati in modo opportuno, potevano contenere miscele di principi attivi abbastanza riproducibili dal punto di vista della quantità, della composizione, della cinetica e dell'effetto clinico (Capitolo 2). Esistono molti problemi connessi con l'uso delle "erbe" a scopo terapeutico: la composizione delle sostanze contenute non è quasi mai nota e può variare (sia in termini di composizione che in termini di quantità di principi biologicamente attivi) a seconda del cultivar utilizzato e delle condizioni di coltivazione; è molto difficile dosare il principio attivo di interesse e quasi mai è possibile dosare gli altri componenti; la stabilità dei componenti spesso non è nota, né lo è il loro metabolismo durante le fasi di preparazione e conservazione, – la contaminazione da batteri e muffe può modificare la composizione iniziale della droga, – la contaminazione da parte di metalli pesanti, riscontrata soprattutto in alcuni preparati della medicina indiana.

Tutti questi fattori, aggiunti alla possibilità di avere per via sintetica i principi attivi presenti nella pianta in modo sicuro e dosabile, hanno confinato la terapia con "erbe" a prodotti privi di importanti effetti farmacologici/terapeutici e generalmente utilizzati per patologie minori (vedi **CD**: Approfondimento 1.1).

Rimedi omeopatici L'omeopatia è stata proposta dal medico tedesco, C. F. Hahnemann agli inizi dell'Ottocento basandosi su una interpretazione filosofica della natura e della medicina che potrebbe essere condensata in queste

sue frasi "usa quindi nella malattia quella medicina che è in grado di provocare un'altra malattia artificiale più simile possibile alla precedente cosicché essa sarà guarita: similia similibus curantur"; "la medicina omeopatica deve essere tanto più salutare quanto più la dose è ridotta". Questa dose può arrivare a 10^{-60} moli/l e oltre. Si tratta di concentrazioni non compatibili con le attuali conoscenze scientifiche sul meccanismo d'azione dei farmaci che prevedono che l'azione farmacologica nasca da una interazione fisica tra un farmaco e un suo recettore.

Anche per questo la documentazione clinica sugli effetti dei rimedi omeopatici è molto carente (vedi **CD**: Approfondimento 1.1).

Prescrizione dei farmaci Un farmaco può essere prescritto dal medico e utilizzato dal paziente dopo che il Ministero della Salute ha concesso l'AIC (Autorizzazione all'Immissione in Commercio) che specifica per quale patologia e per quali tipi di malati il farmaco sia prescrivibile. L'autorizzazione è concessa in base ai dati preclinici e clinici di efficacia e sicurezza che emergono dalla sperimentazione (vedi Capitoli 3 e 4). La prescrizione è ammessa solo per le indicazioni contenute nell'AIC, il cui numero è indicato sulla confezione, e riportate nel foglietto illustrativo. Ci possono essere due eccezioni alla regola: l'uso *off label* e l'uso *compassionevole*.

Si intende per uso *off label* l'impiego di un farmaco già in commercio per una indicazione clinica non compresa nell'AIC. Questo può verificarsi quando, in base a nuovi dati della ricerca, sia stata messa in evidenza l'utilità di un composto noto per patologie diverse da quelle previste al momento della registrazione.

L'uso *compassionevole* riguarda, invece, un farmaco, ancora in sperimentazione, al di fuori dei protocolli clinici di sperimentazione approvati. È possibile che durante gli studi clinici emergano indicazioni abbastanza consistenti del possibile uso di un farmaco in sperimentazione per patologie o malati non contemplati nel disegno originale degli studi. In questo caso i problemi possono riguardare sia la sicurezza che l'efficacia.

In base ai dati presenti in letteratura, il medico, sotto la sua responsabilità, può chiedere di somministrare il farmaco in via eccezionale.

I due usi devono essere in ogni caso autorizzati dal Comitato Etico.

Placebo Con questo termine si intende una sostanza inerte e priva di effetti biologici rilevanti sull'organismo. Confezionato con una preparazione farmaceutica uguale a quella di un farmaco, viene utilizzato per "compiacere" un paziente e ottenere così una risposta terapeutica non in base a un'azione farmacologica, ma in base a un effetto psicologico. Il placebo è spesso utilizzato in studi clinici controllati per differenziare all'interno dell'azione terapeutica quanto dovuto all'effetto farmacologico vero e proprio e quanto dovuto a effetti scatenati da fenomeni psicologici indotti dal contesto nel quale il farmaco viene somministrato. Può avere anche un effetto negativo e in questo caso è chiamato nocebo (vedi **CD**: Approfondimento 4.2. Il placebo).

Discipline che studiano i farmaci

Farmacologia La farmacologia è la branca delle scienze biomediche che studia i farmaci e le interazioni reciproche che hanno luogo tra questi e gli organismi viventi. Gli studi possono essere condotti a livello molecolare, cellulare, di organo, di sistema, di individuo, di popolazione, di ambiente.

Farmacologia generale È quella branca delle scienze farmacologiche che analizza i meccanismi generali che sottendono all'azione dei farmaci. Essa è classicamente suddivisa in farmacodinamica e farmacocinetica, molto sinteticamente definiti da Benet nell'introduzione alla IX edizione del Goodman and Gilman: ciò che il farmaco fa al corpo (farmacodinamica) e ciò che il corpo fa al farmaco (farmacocinetica). La conoscenza di questi eventi nei loro aspetti quantitativi permette di adattare il dosaggio di un farmaco al singolo individuo limitando gli errori, in eccesso o in difetto, responsabili di possibili effetti tossici o di inefficacia/inutilità della terapia.

Farmacologia cellulare e molecolare È la branca della farmacologia che affronta il problema di comprendere la natura/struttura delle molecole dell'organismo con cui i farmaci interagiscono e/o gli eventi molecolari e cellulari che sottendono agli effetti sistemici dei farmaci.

Farmacognosia Si occupa delle medicine di origine naturale o droghe, dello studio, della caratterizzazione e della catalogazione delle fonti botaniche e animali dei farmaci, delle caratteristiche di farmaci allo stato naturale, delle metodologie per identificare, isolare, quantificare i principi attivi presenti nelle fonti naturali o droghe e studiarne le proprietà farmacologiche, dei criteri per distinguere le fonti naturali originali dei farmaci da quelle false.

Farmacologia clinica È la branca della farmacologia che studia l'efficacia terapeutica e la sicurezza d'uso di un farmaco nell'uomo. Gli studi di farmacologia clinica utilizzano consolidate metodologie scientifiche (reclutamento di pazienti, studi clinici controllati, analisi statistica dei risultati) con le quali impostare e valutare gli studi e alle quali è necessario aderire per ottenere le certificazioni necessarie per la vendita e messa in commercio di farmaci.

Farmacoeconomia È la branca della farmacologia che studia i rapporti di costo/beneficio di un trattamento farmacologico dal punto di vista economico. La rilevanza pratica di questa branca della farmacologia cresce ogni giorno di più vista la difficoltà generalizzata incontrata dai Paesi a sostenere le spese di assistenza medico-farmaceutica. La disciplina affronta anche i problemi più generali di come l'uso dei farmaci si ripercuota su altri indici economici, come la spesa sanitaria e la gestione economica della salute. Sono oggetto della farmacoeconomia anche i problemi relativi ai rapporti tra economia e industria farmaceutica, tra attività produttiva, ricerca farmaceutica e lo sviluppo dell'economia di un Paese. Il suo apporto è fondamentale per una gestione corretta della politica sanitaria e per la programmazione dello sviluppo dell'industria farma-

ceutica. Dato l'ambito di interesse, la farmacoeconomia presenta anche aspetti rilevanti di ordine etico.

Farmacogenetica Studia la risposta ai farmaci nelle diverse popolazioni e nei singoli individui e identifica i motivi genetici di queste diversità. Differenze su base genetica di espressione o di attività di molecole dell'organismo possono rendere conto di risposte abnormi ai farmaci in termini sia farmacodinamici che farmacocinetici.

Dalla farmacogenetica sono attesi anche contributi importanti sul meccanismo d'azione dei farmaci e sulla eziopatogenesi delle malattie. Recentemente essa è stata affiancata dalla farmacoepigenetica, la disciplina che studia come interferire con i farmaci sulle modificazioni della cromatina e del DNA che regolano le funzioni genomiche, ad esempio controllando le metilazioni o le modificazioni istoniche.

Farmacogenomica Studia come farmaci e tossici modificano l'espressione di geni e proteine in un dato tessuto o organismo, e come questo si possa correlare a un beneficio terapeutico. Studia inoltre nuovi potenziali bersagli terapeutici avvalendosi delle conoscenze e delle tecnologie derivate dallo studio del genoma e degli RNA. Sia la farmacogenetica che la farmacogenomica pongono importanti interrogativi etici a livello di ricerca e di applicazione clinica che dovranno essere approfonditi anche a livello legislativo.

Farmacovigilanza È la branca della farmacologia che tiene sotto controllo la sicurezza di un farmaco monitorando, a livello ospedaliero e di popolazione, l'insorgenza di effetti collaterali o tossici per l'individuo o per la popolazione che si osservano dopo l'immissione in commercio del farmaco. Essa è di grande importanza per rilevare fenomeni tossici rari che sono riconoscibili solo con l'esposizione al farmaco di centinaia di migliaia di pazienti e per studiare l'appropriatezza delle prescrizioni effettuate nella pratica clinica.

Chemioterapia Letteralmente è la terapia condotta con sostanze di sintesi chimica. In realtà, il termine ha accezione più ampia e sta a indicare quelle forme di terapia (effettuate con sostanze di sintesi e anche con sostanze estratte da sorgenti naturali) che mirano alla lesione di cellule viventi dannose per la salute: gli agenti infettivi o le cellule neoplastiche.

Tossicologia Studia gli effetti dannosi su uomo, animali e piante di sostanze esogene come farmaci, prodotti naturali, contaminanti, additivi e fitofarmaci. Gli studi tossicologici sono essenziali e irrinunciabili per la caratterizzazione e la commercializzazione di un farmaco. La legge attuale prescrive che la caratterizzazione tossicologica sia condotta per qualunque sostanza (medicamentosa e non) che si intenda immettere nel commercio; è tuttavia da segnalare che i criteri di ammissibilità (mancanza di effetti nocivi alla salute) sono notevolmente più restrittivi per i farmaci a uso terapeutico rispetto ad altri prodotti assunti quotidianamente (dai prodotti cosmetici agli additivi alimentari).

Interazioni tra un farmaco e i sistemi viventi

Recettore Indica la molecola la cui funzionalità è modificata dall'interazione con un farmaco. La sostanza che si lega al suo recettore viene, in genere, chiamata ligando. La natura e le funzioni del recettore possono essere svariate (enzima, pompa, canale ionico ecc.). Negli ultimi anni si è sviluppata la tendenza a limitare il termine recettore a quelle molecole che in natura sono adibite a trasmettere a una cellula un'informazione portata da una sostanza diffusibile liberata nello spazio extracellulare (detta primo messaggero: neurotrasmettitore, ormone ecc.).

Un recettore ha molti siti sui quali si possono legare i farmaci, che vengono detti: *siti ortosterici*, quando il ligando, legandosi, produce un effetto diretto sulla funzione recettoriale, e sono i siti sui quali si legano neurotrasmettitori e ormoni; e *siti allosterici*, quando un ligando, legandosi, non produce un effetto diretto, ma influenza in modo positivo o negativo la risposta del recettore al suo ligando. Vi sono diverse ipotesi che spiegano come un ligando possa modificare la risposta di un recettore:

- il ligando legandosi al sito ortosterico del recettore ne modifica la struttura quaternaria e quindi la funzione in modo positivo (agonista) o negativo (antagonista);
- il recettore può esistere in due o più stati conformazionali reversibili (aperto o chiuso, attivo o inattivo) e il ligando può stabilizzare o selezionare una forma conformazionale del recettore e quindi una sua attività funzionale. In alcuni casi o in seguito a modificazioni post-traduzionali, un recettore può essere presente in uno stato *attivo* anche in assenza di un agonista. Quest'ultima, ipotesi, prospettata nel 1966 da Monod, Wyman e Changeau, è quella che meglio rende conto di molti dati sperimentali.

Affinità È la misura della capacità di un farmaco di legarsi al suo recettore. Essa è correlata inversamente alla costante di dissociazione del complesso farmaco-recettore. Operativamente, è $-\log$ della concentrazione necessaria a legare il 50% dei siti di legami presenti. Maggiore è l'affinità, minore è la concentrazione necessaria affinché tale valore venga raggiunto.

Competizione È la condizione che si verifica quando due farmaci riconoscono lo stesso sito di legame ed entrano in competizione tra loro per legarsi. L'ostacolo che i due farmaci si provocano reciprocamente riduce la loro affinità apparente per il sito di legame. Se uno dei due farmaci si lega irreversibilmente al sito di legame, l'interazione diventa non competitiva in quanto il secondo non sarà più in grado di interagire con i siti di legame stabilmente occupati dal ligando irreversibile.

Agonista Si definisce agonista un farmaco che legandosi a un recettore aumenta la probabilità che esso sia presente in stato attivo generando una risposta biologica.

Agonista o antagonista allosterico Il termine identifica quei farmaci che sono privi di attività intrinseca (cioè sono incapaci di attivare o inibire un recettore), ma che si legano a un recettore su un sito diverso (allosterico) da

quello dell'agonista/neurotrasmettitore endogeno modificandone così l'efficacia e/o la potenza in senso positivo o negativo.

Antagonista Si definisce antagonista un farmaco che legandosi a un recettore ne impedisce l'interazione con l'agonista. Per quanto riguarda l'effetto generato, esso è rilevabile quando l'agonista è presente mentre manca in assenza di agonista. Il termine non è da confondersi con quello di antagonismo funzionale che viene riservato per quei casi in cui due farmaci agiscono su recettori diversi che mediano risposte contrapposte (ad esempio, l'effetto di un farmaco attivo sull'ortosimpatico è spesso contrastabile funzionalmente da un altro farmaco attivo sul sistema parasimpatico). I farmaci che bloccano macromolecole a funzione non recettoriale (ad esempio, enzimi) sono più comunemente definiti inibitori.

Agonista parziale È un farmaco in grado di attivare solo in parte un recettore.

Agonista inverso È un farmaco che legando un recettore riduce la probabilità che esso sia presente in stato attivo in assenza del ligando. Quindi, a differenza di quanto succede con un antagonista, anche il "segnale di fondo" del recettore viene inibito.

Misura degli effetti

Efficacia L'efficacia esprime l'entità dell'effetto generato. Il termine è stato coniato da Stephenson per paragonare agonisti che legandosi nella stessa proporzione a una popolazione di recettori producevano effetti di entità diversa. Nel valutare l'efficacia di farmaci diversi ci si deve riferire a uno stesso effetto. Non è da confondere l'efficacia con l'utilità terapeutica.

Potenza Il termine potenza esprime la dose (o concentrazione) necessaria per produrre un effetto di entità prestabilita (ad esempio, il 50% dell'effetto massimo, dose efficace, ED_{50} , o concentrazione efficace, EC_{50}). Rispetto ad altre caratteristiche di un farmaco (come selettività, tossicità ed efficacia) è spesso da considerarsi la meno importante in quanto si può ovviare alla mancanza di potenza semplicemente aumentando la dose (in genere la dose non è il fattore limitante di una terapia).

Selettività A livello molecolare esprime la capacità di un farmaco di interagire con un numero ristretto (preferibilmente una sola) di macromolecole. A livello di organismo esprime la capacità di generare risposte riconducibili alla modulazione di un unico sistema funzionale. In genere la selettività diminuisce all'aumentare della concentrazione/dose utilizzata.

Desensitizzazione La riduzione della capacità di un sistema recettoriale di generare una risposta al farmaco indotta dall'esposizione al farmaco stesso (o suo analogo).

Downregulation Riduzione del numero di siti di legame/recettori per un farmaco. È generalmente indotta dall'esposizione prolungata al farmaco stesso (o suo analogo).

Benché desensitizzazione e downregulation comportino entrambi una riduzione della capacità di una cellula/sistema di rispondere a una stessa concentrazione di farmaco, generalmente il termine desensitizzazione indica una riduzione della capacità molecolare di trasdurre il segnale, mentre il termine downregulation indica una riduzione del numero di recettori attivabili/legabili dal farmaco.

Tolleranza Il termine esprime la riduzione della capacità di un organismo di rispondere alla somministrazione ripetuta di un farmaco. La tolleranza può trovare le sue basi cellulari e molecolari nei processi di desensitizzazione e downregulation. Da non confondersi con il termine "dipendenza". Una tolleranza che si instaura rapidamente viene chiamata tachifilassi. Sia la tolleranza che la tachifilassi può essere crociata: un farmaco può indurre una risposta modificata dell'organismo a un altro farmaco.

Sensibilizzazione È un aumento graduale della risposta a una dose costante di farmaco ripetuta più volte; può essere vista come l'inverso della tolleranza.

Dipendenza Indica l'uso compulsivo di un farmaco con attività psicoattiva, che nasce da un suo uso ripetuto e continuo. Può associarsi a tolleranza. La sospensione brusca del farmaco provoca una sindrome con sintomatologia psichica e fisica molto intensa e spesso assai spiacevole che viene chiamata sindrome da astinenza. La sintomatologia può comprendere effetti di stimolazione del sistema nervoso autonomo, neuromuscolare ed effetti opposti a quelli normalmente esplicati dal farmaco.

Effetti collaterali Sono gli effetti di un farmaco diversi da quelli per i quali è ammesso il suo uso clinico. Possono essere utili o dannosi. Possono essere dovuti allo stesso meccanismo d'azione che genera l'effetto terapeutico (ad esempio, tachicardia per gli antispastici attivi sul sistema

parasimpatico) o a un meccanismo totalmente differente. Possono insorgere a dosi pari a quelle terapeutiche (ad esempio, ipotensione ortostatica per i nitroderivati antianginosi), ma, più comunemente, sono osservabili a dosi superiori e talvolta anche a dosi inferiori a quelle terapeutiche. Nelle manifestazioni più gravi, si usa il termine effetti tossici o reazioni avverse.

Rapporto rischio-beneficio È il rapporto che mette in relazione il rischio provocato alla salute del paziente dagli effetti collaterali o tossici di un farmaco con gli effetti benefici che esso può produrre. È una valutazione relativa, e spesso soggettiva, che deve tenere conto della gravità della malattia da curare e della percezione della qualità della vita del paziente.

Indice terapeutico È il rapporto tra la dose (o la concentrazione) capace di produrre effetti utili e la dose responsabile di effetti collaterali/tossici (ad esempio, dose tossica, o dose letale). Perché l'indice sia di qualche utilità, occorre precisare quali sono gli effetti benefici e tossici che si considerano e la loro entità.

Metanalisi È la tecnica di analisi dei risultati clinico-farmacologici riportati in diversi lavori (già pubblicati) e/o diversi esperimenti, anche non concordanti tra loro, che consente di estrapolare conclusioni/dati statisticamente significativi su un particolare effetto terapeutico. Sommando le casistiche di studi diversi, uno studio di metanalisi consente di aumentare la potenza statistica delle osservazioni che, nei singoli studi, sono spesso basate su numeri così bassi da essere inadeguate dal punto di vista statistico. Nello svolgere una metanalisi, particolare attenzione viene posta sulle modalità di realizzazione degli esperimenti e sulla loro validità metodologica. Essa fornisce la base principale per la stesura di linee guida terapeutiche e per la medicina basata sull'evidenza.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ La farmacologia, iniziata nei tempi più antichi, ha recentemente rivoluzionato la terapia e molti degli aspetti sanitari e sociali degli individui.
- ▶ L'effetto farmacologico nasce dall'interazione tra una sostanza e una o più molecole dell'organismo.
- ▶ Gli effetti farmacologici dipendono dalla dose e sono misurabili quantitativamente.
- ▶ Esistono effetti terapeutici che non dipendono da effetti farmacologici (effetto placebo).
- ▶ Lo sviluppo della farmacologia ha fatto nascere branche specialistiche di questa disciplina che si occupano in modo approfondito dei diversi aspetti della scienza del farmaco soprattutto negli ambiti di confine con altre discipline.

Breve storia della farmacologia

Vittorio A. Sironi

Obiettivi formativi

- ▶ Percorrere la storia dell'uomo alla ricerca di rimedi efficaci per il dolore e la malattia
- ▶ Comprendere come è nata, come si è evoluta e in quale direzione si muove la farmacologia

Nascita ed evoluzione della farmacologia

La medicina primitiva e antica: rimedi magici e naturali

Sin dall'antichità l'uomo ha cercato rimedi contro il dolore e la malattia: dapprima in modo empirico, attraverso il casuale riscontro delle proprietà benefiche di una procedura o di un'erba, poi in modo speculativo, partendo dall'idea secondo cui un'entità estranea – o spirito malvagio –, impossessandosi dell'individuo – del suo corpo e/o della sua anima –, vi provocasse una malattia. In tal caso la guarigione comportava la cacciata dello spirito maligno tramite un rituale fatto di esorcismi e di pratiche “magiche”.

Anche gli Egizi, che pure facevano ricorso a sostanze vegetali o animali non prive di efficacia (il *Papiro di Ebers*, risalente al 1500 a.C., il più completo codice medico dell'antichità, cita l'olio di ricino, la senna, il melograno, il tannino, l'oppio, l'aloe, la menta), erano soliti accompagnare la preparazione e la somministrazione di tali sostanze con scongiuri e recitazione di formule miranti ad allontanare il “demone” della malattia. Ugualmente gli Ebrei, che basavano buona parte delle loro pratiche preventive e curative sulla stretta osservanza di precise norme igieniche (ma che conoscevano anche il sicomoro, l'issopo, il cumino, il pino), traevano dall'elemento religioso caratterizzante il loro modo di vita una valenza “terapeutica” di grande rilievo.

Il razionalismo greco e romano

La concezione umoralistica di ascendenza ippocratico-galenica (Ippocrate, 460-377 a.C.; Galeno, 129-199 d.C.) contempla la malattia come uno sconcerto della tetrade

umorale (sangue, flegma, bile, atrabile) propria dell'organismo. La tetrapartizione degli umori è simmetrica a quella degli elementi primordiali (terra, acqua, aria, fuoco), delle qualità elementari (freddo, caldo, umido, secco), delle stagioni dell'anno (primavera, estate, autunno, inverno), delle età della vita (puerizia, giovinezza, maturità, vecchiaia). La scienza greca dei farmaci – *pharmacologia* è parola greca che significa insieme rimedio e veleno – si sviluppa inizialmente nell'ambito della dietetica attraverso un gioco complesso di rimandi tra “qualità” delle sostanze prescelte e “temperamenti” (sanguigno, flemmatico, bilioso, atrabile) dell'organismo malato.

Negli scritti del *Corpus hippocraticum* per la prima volta sono espresse in modo sistematico le regole per raccogliere i “semplici” vegetali (elleboro, oppio, belladonna, veratro, ruta, menta), le norme per preparare i medicamenti (suddivisi in purganti, narcotici, diaforetici, diuretici, emetici), le modalità del loro impiego nella cura delle diverse malattie.

Sistematicità e razionalismo naturalistico si ritrovano anche nella “biologia” di Aristotele (384-282 a.C.) e del suo allievo Teofrasto (370-286 a.C.), autore quest'ultimo di una *Historia plantarum* che non è solo un analitico e ordinato tentativo tassonomico, ma anche un vero trattato di fitoterapia: vi sono infatti descritti con precisione il papavero, la cicuta, la mandragora (Figura 2.1), l'elleboro, ciascuno con i suoi effetti. È un'opera che può considerarsi precorritrice dei testi di “farmacologia vegetale” che dal Medio Evo in poi tanta parte avranno nella fondazione dell'arte speciale.

In Roma medicina e farmacologia proseguono nel tracciato dei Greci. Aulo Cornelio Celso, Scribonio Largo e Plinio il Vecchio riportano, nelle loro opere, la *summa* delle conoscenze via via maturate. Chi le rielabora e le accresce, lasciando un'impronta destinata a durare nei secoli, è Dioscoride Pedanio, chirurgo militare greco

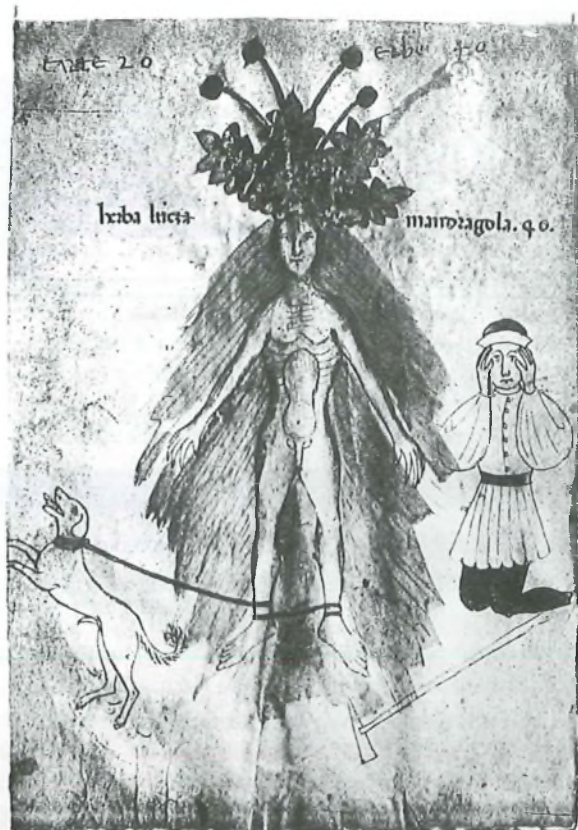


FIGURA 2.1 Rappresentazione della mandragora in un erbario del secolo XV. La pianta veniva fatta strappare da un cane, perché si credeva che facesse morire chi l'avesse sradicata. Morto il cane, la mandragora proteggeva l'uomo contro tutti i malefici (Pavia, Biblioteca Universitaria).

poi divenuto cittadino romano e vissuto nel I secolo d.C. L'opera di Dioscoride (universalmente nota con il titolo di *De materia medica*, dalla prima versione latina con commento di Pietro Andrea Mattioli pubblicata a stampa nel 1478) resterà sino al XVIII secolo un classico della farmacologia. In 5 libri, suddivisi in 827 capitoli, sono elencate tutte le sostanze medicamentose di origine vegetale (650), animale (85) e minerale (50).

Ugualmente universale e durevole è l'influenza esercitata da Galeno. La sua opera *De simplicium medicamentis et facultatibus*, dedicata alla terapia, elenca 473 medicinali di origine vegetale che resteranno per un millennio e mezzo la base indiscussa dell'arte della cura in Europa. Con fedeltà alla concezione umorale della malattia, applicare rimedi ai malati significa per Galeno adottare, nelle varie fasi evolutive delle malattie, medicinali con azione ed effetti opposti a quelli del male: farmaci "riscaldanti" nelle malattie o nelle loro fasi "fredde", farmaci "perfrigeranti" nelle malattie o nelle loro fasi "calde". "*Contraria contrariis curantur*" è la massima o aforisma principe della farmacoterapia galenica. Questa prescrive inoltre che il medico prepari lui stesso il medicamento (dove il termine *galenico* tuttora in uso) e lo somministri in modo oculato e con parsimonia.

Tra le molteplici e varie preparazioni medicamentose del tempo figuravano: *catapoksi* (pillole semplici), *cerotti*, *linimenti*, *trocisci* (impiastrici di polveri con aceto e vino), *terre rare* (dette anche *terre sigillate* per il sigillo di provenienza che vi era impresso), argille accreditate di virtù terapeutiche particolari, e la *triacca* o *teriaca*, miscela composta da molti ingredienti (tra cui, al primo posto, il tritato di vipera), usata come antidoto contro tossici e veleni. La sua formula era tenuta segreta e la sua preparazione era una pratica iniziatica, riservata ai soli addetti (vedi CD: Approfondimento 2.1. *I farmaci degli antichi*).

Tra alchimia e magia naturale

La caduta, nel 476 d.C., dell'Impero Romano d'Occidente segna l'inizio del Medio Evo e consegna all'emergente civiltà araba il primato della conoscenza in ambito medico e farmacologico. L'uso di sostanze medicinali costituisce anzi il cardine delle cure dell'arabismo medico. La medicina di Avicenna e Avenzoar rifugge dalle pratiche cruente della chirurgia "ferramentaria" e, come testimoniano le opere di Albucasis, predilige le pratiche diversamente curative della chirurgia "medicamentaria" (dove al termine chirurgia viene conservato il significato di "manualità"). La cultura araba diffonde in Occidente anche l'*alchimia* (letteralmente: "mescolamento"), una pratica empirica e di duplice valenza, che da un lato permette di sviluppare le conoscenze su alcune procedure che si potrebbero definire "protochimiche" (distillazione, riscaldamento e bagnomaria), atte a ottenere composti, alcuni anche nuovi (ammoniac), mentre dall'altro spinge verso realizzazioni utopistiche, immaginate o sognate, quali risposte magico-naturali ai problemi esistenziali della salute (elisir di lunga vita) e della povertà (pietra filosofale).

Dalla medicina monastica agli orti botanici

Nell'imbarbarimento medioevale dell'Occidente, è grazie allo spirito "conservatore" degli ordini monastici che nei conventi si serbano tradizioni, si tramandano saperi, si sviluppano novità. Si preservano e si trascrivono i codici antichi, si problematicizzano i loro contenuti, si elaborano nuovi modelli. L'assistenza conventuale ai *pauperes infirmi* rappresenta un modello destinato a dar vita ai moderni ospedali e l'erboristeria monastica della *coltura* dei "semplici" costituisce un modo di ulteriore arricchimento della farmacoterapia.

Per l'influsso della medicina monastica sorge e si sviluppa nei secoli XI e XII la Scuola medica salernitana, primo centro di medicina laica, luogo di incontro geografico e di intreccio culturale fra la tradizione greco-romana e l'elaborazione araba. Il *Regimen Sanitatis Salernitanum* (una silloge in versi di consigli per conservare la salute e vivere a lungo) costituisce, insieme all'*Antidotarium* di Nicolò Salernitano e all'*Ars medendi* di Cofone, una triade di opere influenzanti nel lungo periodo la medicina europea. La nascita delle corporazioni d'arti e mestieri, tra cui quella dei medici e degli speziali, e la definizione giuridica del ruolo distinto delle due professioni sono di poco po-

steriori. Le *Ordinationes* emanate nel 1240 dall'imperatore di Sicilia Federico II (1191-1250) ridisegnano medicina e farmacia nel loro aspetto istituzionale, ma anche in quello scientifico. L'*Antidotarium* di Nicolao Preposito elenca i metodi di preparazione dei medicamenti e codifica i criteri per fare di essi un uso rigoroso e non aleatorio. Codice ed elenco rappresentano un *terminus a quo* delle successive farmacopee.

Con la nascita delle Università, entro le quali viene trasmesso e appreso un sapere scientifico codificato, seguita dalla scoperta della stampa (1450), grazie a cui viene enormemente accelerata la circolazione delle idee, la cultura medica e farmaceutica si dilata con velocità e ampiezza sorprendenti. Oltre al rinnovato interesse per la sterminata *Naturalis historia* pliniana (stampata a Venezia nel 1469) e alla già citata versione latina dell'opera di Dioscoride da parte di Pietro Andrea Mattioli (1478), la scoperta del Nuovo Mondo da parte di Cristoforo Colombo (1492) è apportatrice, nell'ambito dell'impegnante farmacologia vegetale, dell'impiego terapeutico di nuove "droghe" d'importazione amerindia. I non pochi *Hortus sanitatis* che si stampano in periodo rinascimentale aggiungono al patrimonio iconografico e scientifico ereditato dal Medio Evo le piante medicinali d'oltreoceano (gialappa, ipecacuana, guaiaco e così via).

Alle soglie del XVI secolo, più precisamente nel 1498, viene stampato a Firenze in lingua volgare il *Ricettario Fiorentino*. È la prima vera *Farmacopea*, un prontuario descrittivo di droghe e medicamenti e delle loro proprietà. Indica agli speziali le procedure compositive e dissociative (oggi diremmo l'analisi e la sintesi), nonché le varie modalità di confezione. Questo "rinascimento" della farmacologia e della farmaceutica ha il suo culmine nella fondazione a Padova, nel 1533 con Francesco Bonafede, del primo Orto Botanico (vedi CD: Approfondimento 2.1).

Dal rinascimento anatomico alla "Experienz": la spagirica di Paracelso

Nella storia della scienza il 1543 è un anno rivoluzionario. La pubblicazione a Basilea dei sette libri a stampa dell'opera *De humani corporis fabrica* di Andrea Vesalio (1514-1564) coincide all'anagrafe della storia con la pubblicazione a Norimberga dei sei libri a stampa dell'opera *De revolutionibus orbium celestium* di Niccolò Copernico (1473-1543). La "rivoluzione anatomica" vesaliana, che reinterpreta il microcosmo dell'uomo, coincide con la "rivoluzione astronomica" copernicana che reinterpreta il macrocosmo dell'universo.

Anche la scienza dei farmaci conosce a metà Cinquecento un processo di revisione e innovazione con una rinascita e un rinnovamento degli studi in questo campo. La "rivoluzione farmacologica" è strettamente legata al nuovo modo di intendere la medicina da parte di un medico riformatore, Teofrasto Paracelso (Figura 2.2) (1493-1541), culturalmente formatosi nel clima di contestazione antiautoritaria proprio della Riforma protestante.

Theophrastus Bombast von Hohenheim (questo il suo vero nome), il "Lutero dei medici" (come viene chia-



FIGURA 2.2 Teofrasto Paracelso (1493-1541). Ritratto di autore ignoto.

mato Paracelso dai suoi epigoni), contesta in blocco la tradizione medica classica – quella di Aristotele, Galeno, Avicenna – quale fonte, a suo dire, di un sapere libresco, diverso da quello leggibile nel grande "libro della natura". Il vero magistero non è nei libri di testo, ma nella *Experienz*, nell'esperienza diretta delle malattie e dei loro veri rimedi, sgorganti dalle viscere della grande "madre terra" come le acque minerali e termali (*aqua vivimus*) e come i *metalla* in esse disciolti.

Nelle "officine della salute" che rappresentano i primi laboratori della nascente protochimica, la paracelsiana alchimia o *chymia* è – con l'astronomia, la filosofia e la virtù – uno dei quattro pilastri della vera medicina. Essa è intesa come "spagirica", un'analisi-sintesi che trae il proprio nome dal greco *spào* (estraggo) e *agèiro* (raccolgo). I veri medici devono occuparsi della "estrazione" come i minatori e del "raccolto" come gli agricoltori. La medicina, secondo Paracelso e i suoi seguaci, deve essere una "agricoltura di uomini", una "alchimia metallurgica" produttiva di farmaci efficaci (Figura 2.3).

Il farmacista paracelsiano è radicalmente diverso dallo speciale della tradizione. Egli indossa non la veste lunga, ma il "vestito del minatore con il grembiule di cuoio del fabbro". In laboratorio attizza il fuoco sotto crogioli e alambicchi, fondendo, distillando, sublimando i metalli. Dall'"immenso magistero della metallica trasformazione" trae nuovi "composti", radicalmente diversi dai "semplici" tradizionali.

Paracelso trae nuovi concetti. Dall'*al-kohl*, "materia" di



FIGURA 2.3 La bottega dell'alchimista. Dipinto di Giovanni Stradano del secolo XVI (Firenze, Palazzo Vecchio).

nero carbone, trae l'analogia lessicale con l'alcol, "spirito" di nero vino. Dall'idea di *caos* trae l'embrione ideologico da cui il suo seguace Van Helmont trae a sua volta il concetto scientifico di *gas*. Dalla personale "esperienza" con i malati, cui lenisce la sofferenza con il *laudano* (tintura di oppio), trae l'aforisma anti-galenico *similia similibus curantur*, valevole non tanto in senso farmacologico, terapeutico, quanto in senso antropologico, curativo. "Il simile si cura col simile" vuol dire che l'infermo si cura con l'infermiere, il povero con il medico dei poveri, l'uomo dei campi con il medico di campagna. Sullo sfondo di questa sapienza paracelsiana si disegna il concetto, o l'effetto *placebo*, che "il buon medico è la prima medicina".

Dalla iatrochimica ai lumi della ragione scientifica

Il Seicento è un secolo di transizione e di contraddizione. Nel 1661 la pubblicazione dell'opuscolo di Boyle *The Sceptical Chemist* segna la nascita della chimica come scienza; negli stessi anni si processano ancora gli "untori", rei di "dare l'ontò" a uomini e cose, cioè di generare e diffondere con mezzi chimici la "peste manufatta".

La strada che porterà a celebrare la ragione come una "dea" – o, meno trionfalisticamente, ad affermare le ragioni della scienza – è comunque già delineata. I medici-fisici, o *iatromeccanici*, di scuola galileiana interpretano l'organismo come una "macchina". Dopo che William

Harvey (1578-1657) ha descritto nel *De motu cordis* (1628) la meccanica della circolazione del sangue, Giovanni Alfonso Borelli (1608-1679) descrive nel *De motu animalium* (1680) la meccanica del movimento muscolare e della locomozione. Alla descrizione harveyana della macromacchina cardiaca propellente il sangue, Marcello Malpighi (1682-1694), facendo sapiente uso dell'"occhialino" (microscopio), aggiunge la descrizione delle micro-macchine glomerulari (renali) e alveolari (polmonari). Alla nuova concezione meccanicistica si affianca l'altrettanto nuova concezione "chemiatria", prevalentemente affermatasi oltralpe. I medici-chimici, o *iatrochimici*, di scuola paracelsiana interpretano l'organismo come "alambiccò" entro una visione "particellare" (atomistica) della materia sia "bruta" (inorganica) che "viva" (organica): una visione democritea ed epicurea, riportata in auge dalla filosofia cartesiana e dal metodo quantitativo di Galileo Galilei.

Dal nuovo contesto teorico non vengono peraltro immediate ricadute pratiche utili in campo farmacologico e farmaceutico. "Non abbiamo rimedi", è costretto ad ammettere Antonio Vallisnieri (1662-1730), professore di medicina pratica e teorica a Padova nel primo Settecento. D'altra parte l'ottica iatromeccanica privilegia le "parti solide" dell'organismo (solidismo), l'ottica iatrochimica le "parti fluide" (umoralismo): riemergono, rinnovandosi, antiche teorie. Con sapiente sincretismo Giovanni Battista Morgagni (1682-1771) elabora nel *De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis* (Venezia, 1761) un'anatomia patologica e una fisiopatologia su rinnovate basi fisico-chimiche. Con altrettanto sagace eclettismo i medici coevi cercano di giovare, e di giovare ai malati, con un armamentario terapeutico dove accanto a nuovi rimedi, tali o presunti, come il "trionfale" *antimonio*, figurano ancora vecchi preparati, come la "magica" *triacca* (Figura 2.4).

In questo *vacuum* farmacologico e farmaceutico esiste tuttavia il *plenum* della monumentale opera linneiana. Il naturalista e medico svedese Carl von Linné (1707-1778) elenca, descrive e riclassifica in una trilogia di trattati – *Systema naturae* (1735), *Philosophia botanica* (1750), *Species plantarum* (1753) – l'intero universo vegetale. I meriti dell'impostazione concettuale (tassonomia binomiale) sono pari ai meriti del rilancio fattuale di una fitoterapia senza dubbio efficace, eppure messa in discussione e in disparte dal grande sviluppo dei "medicamenti chimici". Un altro svedese, il farmacista di origine tedesca Karl W. Scheele (1742-1786), è l'iniziatore della chimica farmaceutica. Lavorando nel retrobottega della sua farmacia di Köping, nei pressi di Stoccolma, nel 1774 scopre l'"aria di fuoco" (ossigeno) tardando però a darne notizia e facendosi precedere dall'inglese Joseph Priestley. Negli anni successivi scopre molte sostanze organiche (gli acidi formico, urico, lattico, citrico e malico, la glicerina) e apre la strada alle ricerche di chimica organica, utilizzate poi nell'Ottocento dalla nascente farmacologia, mentre tra i lumi della ragione scientifica e i fuochi della Rivoluzione francese Antoine-Laurent Lavoisier (1743-1794) confuta la vecchia "teoria del flogisto" e pone le basi della nuova chimica quantitativa.



FIGURA 2.4 Lo speziale. Dipinto di Pietro Longhi del secolo XVIII (Venezia, Galleria dell'Accademia).

Dalla ricerca del principio attivo alla scoperta di alcaloidi e glucosidi

Il Settecento si chiude con i primi tentativi di estrarre dal "semplice" (il medicamento) la frazione ritenuta efficace dal punto di vista terapeutico. L'Ottocento inizia invece con lo sforzo della chimica farmaceutica di compiere il passo decisivo per l'isolamento dalle piante medicinali (principalmente china, oppio, tabacco) del "principio attivo" responsabile dell'effetto curativo, per poterlo purificare e produrre in grande quantità.

In modo sempre più perfezionato e con un grado crescente di consapevolezza nel 1803 Louis-Charles Derosne, nel 1807 Friederich W. Serturner e nel 1817 Joseph Gay-Lussac isolano la morfina dall'oppio. Nel 1809 Louis-Nicolas Vauquelin separa la nicotina dal tabacco e nel 1820 Pierre-Joseph Pelletier e Joseph-B. Caventou dalla china isolano la chinina, dimostrando che è a questa sostanza che si deve l'effetto antipiretico (empiricamente noto da tempo) della corteccia della china. Completeranno le loro scoperte isolando dalla noce vomica la stricnina e dal caffè la caffeina.

Tutte queste sostanze, chimicamente caratterizzate da un comportamento basico, contenenti azoto e in grado di formare sali in combinazione con gli acidi, vengono chiamate nel 1821 da Wilhelm Meissner *alcaloidi*. A questa ben presto si affianca un'altra classe di principi attivi, distinti dai primi per il fatto di non avere proprietà basiche e in grado di dare, scindendosi, glucosio come prodotto secondario: i *glucosidi*, di cui due in particolare

– la digitalina scoperta da Roger nel 1834 e la salicilina identificata da Leroux nel 1839 – assumono un ruolo importante in farmacologia.

La scoperta degli alcaloidi e dei glucosidi è la prosecuzione di quegli studi di "chimica organica" iniziati empiricamente da Karl Scheele, continuati in modo più sistematico da Justus von Liebig (1803-1873) e culminati con la sintesi, nel 1831, da parte di Friedrich Wöhler (1800-1882), dell'urea: un composto organico ottenuto in laboratorio a partire da sostanze inorganiche (carbonio e azoto); un fatto di cui inizialmente non si coglie la portata "rivoluzionaria", perché l'urea, presente nell'urina, appare non tanto un prodotto di processi vitali, quanto un prodotto del loro degrado, come tale escreto dall'organismo.

Insieme a quella degli anestetici, queste scoperte rappresentano le maggiori realizzazioni della "nuova farmacologia" ottocentesca. I suoi più insigni rappresentanti sono quelle figure di fisiologi-farmacologi (come François Magendie, Rudolf Buchheim, Carl Binz, Oswald Schmiedeberg e in Italia, Andrea Giacomini, Giovanni Semmola e Arnaldo Cantani) in grado di studiare l'interazione tra organismo e farmaco per valutare di quest'ultimo gli effetti terapeutici e quelli tossici, applicando in farmacologia le idee innovative che, in ambito medico e biologico, avevano in quegli anni rivoluzionato le precedenti concezioni: la *médecine expérimentale* di Claude Bernard (1813-1878), la *cellularpathologie* di Rudolf Virchow (1821-1902), le "ipotesi germinali" di Louis Pasteur (1822-1895) e la "biologia dei microbi" di Robert Koch (1843-1910).

La rivoluzione dei farmaci di sintesi: dalla produzione artigianale alla fabbricazione industriale

La necessità di poter disporre di una grande quantità di estratti vegetali terapeuticamente attivi (alcaloidi e glucosidi) porta in Germania (il paese europeo che dopo l'Inghilterra era in Europa quello più avviato al processo di trasformazione economico-sociale legato alla rivoluzione industriale e nel quale la cultura scientifica fisico-chimica era particolarmente avanzata) il farmacista Henrich E. Merck (1794-1855) a fondare nel 1827 la prima fabbrica per la produzione con criteri protoindustriali di cocaina e morfina, grazie alla trasformazione dell'avita secolare spezieria di Darmstadt in un attrezzato laboratorio artigianale.

La vera novità dell'Ottocento in campo farmacologico è la nascita di medicinali per *sintesi chimica*: non più estratti di sostanze vegetali o minerali presenti in natura, ma composti "costruiti" artificialmente in laboratorio, in grado di svolgere un'azione farmacologica selettiva ed efficace sull'organismo malato. Questa rivoluzione farmacologica avvia il processo di industrializzazione della produzione farmaceutica, facendo del farmaco (*specialità farmaceutica*) un rimedio innovativo per le sue enormi capacità curative e per la sua ampia e facile disponibilità, ma anche un prodotto in grado di determinare un profitto economico e come tale sottoposto alle rigide regole del mercato commerciale.

Le nuove modalità di produzione farmaceutica rispondono anche ai bisogni emergenti dalla rapida trasformazione che la società subisce in seguito al fenomeno, sempre più diffuso, dell'industrializzazione: inurbamento, aumento della patologia infettiva, peggioramento della qualità dell'esistenza, necessità di mantenere al massimo integra la forza lavoro.

I paesi di cultura e lingua tedesca (Germania e Svizzera) sono quelli in cui, per il concorrere di molteplici fattori (presenza di una importante industria chimica, disponibilità di notevole capitale economico, favorevole spirito imprenditoriale, innovativa visione medico-biologica), questa industria si sviluppa come continuazione o filiazione di quella chimica dei coloranti: Bayer e Hoechst (1863), BASF (1865) e Schering (1871) in Germania, CIBA e Geigy (1884), Sandoz (1886) e Hoffman-La Roche (1894) in Svizzera sono le prime e principali industrie di coloranti e di farmaci che sorgono in quegli anni.

La ricerca di sostanze capaci di alleviare il dolore o di esplicare un'azione antipiretica mimando gli effetti degli estratti vegetali resta l'obiettivo da raggiungere. La *fenacetina*, scoperta nel 1887 da Anton Kast e Karl Hinsberg, brevettata e introdotta sul mercato nel 1888 dalla Bayer, è il primo vero farmaco sintetico clinicamente utilizzato prodotto dall'industria farmaceutica. Un decennio più tardi, esattamente nel 1899, sempre la Bayer commercializza un altro composto destinato a segnare una tappa miliare della storia farmacologica e farmaceutica: l'*aspirina*, l'acido acetilsalicilico, scoperto nel 1898 da Felix Hoffman (in realtà riscoperto perché il prodotto era già stato preparato sin dal 1853 da Charles E Gerhardt) come rimedio valido e più tollerato dell'acido salicilico contro reumatismi e dolori.

Nei Paesi di lingua latina (Italia e Francia) l'industria farmaceutica prende invece avvio dalla trasformazione dei numerosi laboratori che affiancano le botteghe degli speziali, i più intraprendenti dei quali (come a Torino Giovanni Battista Schiapparelli nel 1823, a Milano Carlo Erba nel 1853, Ludovico Zambelletti nel 1864 e Roberto Giorgio Lepetit nel 1868) danno vita a importanti stabilimenti farmaceutici (vedi CD: Approfondimento 2.2. *La nascita dell'industria farmaceutica in Italia*).

La farmacologia moderna

Ehrlich e la chemioterapia: il concetto di recettore

I nuovi farmaci di sintesi prodotti dalla nascente industria farmaceutica riescono a eliminare o ad attenuare i sintomi più gravi che accompagnano le malattie (come la febbre o il dolore), ma non sono in grado di ridurre l'incidenza delle infezioni che, all'inizio del Novecento, rappresentano ancora la stragrande maggioranza delle manifestazioni patologiche dell'umanità.

L'impiego di sieri e vaccini (soprattutto per la difterite e il tetano) e il ricorso sempre più sistematico al chinino (per la malaria) forniscono certamente un contributo importante, ma non ancora sufficiente, per ridurre l'incidenza

di determinate malattie infettive. Per debellare definitivamente le infezioni (causate, come ormai la scienza medica aveva ampiamente dimostrato, dalla presenza di germi patogeni all'interno dell'organismo malato) occorre utilizzare sostanze che, introdotte nel corpo malato, agiscano come "proiettili magici" uccidendo selettivamente i germi senza danneggiare l'ospite, realizzando quella *therapia sterilisans magna* della malattia che era stato l'obiettivo inseguito ma mai raggiunto dalla medicina della seconda metà dell'Ottocento.

Un nuovo farmaco messo in commercio nel 1910 dalla Hoechst per combattere la sifilide, il *Salvarsan* (chimicamente un derivato dell'arsenico, l'arsenobenzolo), sembra possedere queste caratteristiche e aprire realmente una nuova era nella lotta contro le infezioni. È il punto d'arrivo delle ricerche di un geniale scienziato tedesco, Paul Ehrlich (1854-1915), convinto assertore dell'importanza della *chemioterapia* per debellare le malattie infettive: una terapia cioè realizzata grazie all'impiego di sostanze chimiche che, introdotte dall'esterno nell'organismo malato, siano in grado di riconoscere, per affinità chimica, i germi patogeni e di distruggerli senza danneggiare altri organi. Sostanze *parasitrope* e non *organotrope*, in grado di fissarsi chimicamente al germe eliminandolo: insomma i proiettili magici sognati dalla medicina ottocentesca.

Benché sul piano terapeutico i risultati ottenuti sulla sifilide dagli arsenobenzoli non fossero così brillanti come si era sperato, tuttavia le idee di Ehrlich rappresentano una tappa fondamentale nel progresso della farmacologia, soprattutto per la chiara intuizione e formulazione del concetto di *recettore* (vedi CD: Approfondimento 2.3. *La chemioterapia di Ehrlich: la teoria dei recettori e la sperimentazione clinica*).

La chemioterapia di Ehrlich rappresenta anche la prima vera esperienza di *farmacologia sperimentale* nel senso moderno del termine, premessa indispensabile all'avvento della *farmacologia terapeutica* realizzata alcuni decenni più tardi dall'impiego dei *sulfamidici* prima e degli *antibiotici* poi.

In quegli stessi anni la chimica inorganica e quella organica ottocentesche continuano nella "chimica della vita" (chimica biologica o biochimica) del primo Novecento, che dalla scoperta di *ormoni* (dal 1905) e di *vitamine* (dal 1911) trae nuove nozioni per una più precisa conoscenza dei processi biochimici all'origine dei meccanismi fisiologici e patologici dell'organismo umano. Si arriva così all'identificazione nella carenza di vitamine dell'origine di malattie (come lo scorbuto, il rachitismo, la pellagra) che per secoli avevano accompagnato l'umanità dolente delle classi subalterne o alla scoperta che disturbi ormonali sono la causa di gravi patologie (come il diabete mellito o il gozzo ipotiroidico) che potevano essere curate somministrando l'ormone mancante estratto da tessuti animali (*opoterapia*).

Sulfamidici e antibiotici: dalla farmacologia sperimentale alla farmacologia terapeutica

Nonostante la delusione degli arsenobenzoli, l'"idea chemioterapica" di Ehrlich restava un'affascinante ipotesi di lavoro in ambito farmacologico. Seguendo questa strada

Gerhard Domagk (1895-1964), un ricercatore della Bayer, sintetizza nel 1932 un composto, il *prontosil rosso*, che ben presto mostra di svolgere un'importante azione antibatterica. Stranamente il composto esplica la sua azione solo in vivo e non in vitro. La ragione di questo insolito comportamento viene evidenziata nel 1935 da un gruppo di ricercatori dell'Istituto Pasteur di Parigi, sotto la guida di Daniel Bovet (1907-1992): l'azione antibatterica è dovuta solo a una parte del composto, il sulfamide, che si ottiene dopo la scissione del colorante operata dall'organismo. Nasce una nuova rivoluzionaria classe di farmaci, i *sulfamidici*, i primi veri prodotti efficaci in gran parte delle malattie infettive.

La vittoria definitiva sulle infezioni si avrà però solo a partire dal 1942, durante gli anni drammatici della Seconda Guerra Mondiale. Iniziano segretamente in quegli anni negli Stati Uniti le prime applicazioni cliniche e la produzione industriale di una sostanza dotata di straordinari poteri *antibiotici*, la *penicillina*, un estratto di muffa scoperto casualmente nel 1929 da Alexander Fleming (Figura 2.5) (1881-1955) e successivamente reso sufficientemente stabile per cristallizzazione nel 1939 da Howard Florey (1898-1955) e Ernst Chain (1906-1979). L'impatto della penicillina (e degli altri antibiotici scoperti successivamente, come la streptomina a opera di Selman A. Waksman nel 1944, il cloramfenicolo e le cefalosporine nel 1947, la neomicina nel 1949, le tetraciline e l'eritrocina nel 1952) sulla medicina e sulla società è enorme, tale da influenzare in modo significativo la durata e la qualità della vita, così da risultare certamente uno tra i più importanti fattori che in questo secolo hanno modificato il cammino dell'umanità.



FIGURA 2.5 Alexander Fleming (1881-1955), scopritore della penicillina.

Sulfamidici e antibiotici rappresentano non solo il punto d'arrivo della concezione chemioterapica di Ehrlich e i primi veri farmaci messi alla prova dalla farmacologia sperimentale per studiare l'interazione organismo-farmaco, ma anche i primi prodotti che permettono alla farmacologia moderna di affiancare a un indirizzo teorico prevalentemente "sperimentale" un approccio più applicativo di tipo "terapeutico".

Dalla *materia medica* d'inizio Ottocento si è giunti alla *farmacoterapia* della seconda metà del Novecento.

Antistaminici e psicofarmaci: nasce la farmacologia moderna

Daniel Bovet (Figura 2.6) (1907-1992), premio Nobel per la medicina nel 1957, è lo scienziato a cui la farmacologia moderna deve i maggiori contributi. Dopo l'importante scoperta fatta nel 1935 sull'azione antibatterica legata ai *sulfamidici*, di cui s'è detto, nel 1937 compie studi fondamentali sull'istamina e sulle sostanze antagoniste (*antistaminici*) e successivamente, nel 1947, con le ricerche sulla gallamina apre la strada ai *curari sintetici*. In particolare, le ricerche sulle *fenotiazine*, prodotti ad azione antistaminica noti da tempo, ma mai adeguatamente indagati, portano nel 1952 all'uso clinico come sedativo in alcune forme di psicosi della *clorpromazina* (*Largactil*) da parte di Jean Delay e Pierre Deniker, segnando l'inizio ufficiale della "psicofarmacologia". L'impiego di *sali di litio* (iniziato nel 1949) e la scoperta di farmaci ad azione antidepressiva (*anti-MAO* e *triciclici*, rispettivamente 1952 e 1957) forniscono ben presto nuovi mezzi per affrontare in modo radicalmente diverso rispetto al passato i gravi problemi



FIGURA 2.6 Daniel Bovet (1907-1992), padre della farmacologia moderna.

della patologia psichiatrica, aprendo la porta della speranza e della libertà a migliaia di esseri infelici destinati prima di allora a languire, sovente per tutta la vita, nelle "prigioni della follia", i manicomi.

Una nuova classe di "tranquillanti minori", le *benzodiazepine*, scoperte da Leo Sternbach, a partire dal 1960 si rivela assai efficace per controllare l'ansia e ridurre l'insonnia. Clordiazepossido (*Librium*, 1960) prima, e diazepam (*Valium*, 1963) poi sono i capostipiti di una famiglia di composti che ha mutato profondamente la vita di milioni di persone di tutto il mondo, migliorandola indubbiamente talvolta, ma creando spesso fenomeni di autentico gratuito consumismo farmacologico e di grave, ingiustificabile e inaccettabile farmacodipendenza.

L'esplosione farmacoterapica e gli sviluppi della farmacologia

Un'autentica "esplosione farmacoterapica" sconvolge il mondo della medicina e della farmacologia nel secondo dopoguerra, a partire soprattutto dagli anni 50. Anche in Italia la ricerca farmacologica accademica e industriale si riorganizza in quel periodo e nascono le principali scuole farmacologiche che hanno permesso uno sviluppo importante in ricerca e in applicazioni terapeutiche (vedi **CD**: Approfondimento 2.3 e Approfondimento 2.5 *La rinascita della farmacologia italiana nel secondo dopoguerra*). Dopo gli sviluppi della psicofarmacologia vengono scoperti e sintetizzati nuovi e più potenti antibiotici (rifampicina, 1957; ampicillina, 1961), alcuni ad azione antimicotica (nistatina, 1950; griseofulvina, 1958), sostanze attive contro la tubercolosi (PAS, 1946; isoniazide, 1952), più attivi antispastici, analgesici e antinfiammatori non steroidei (FANS) che permettono in alcune malattie croniche, valide alternative all'uso del *cortisone* (impiegato in terapia nel 1949). La cura del diabete mellito si arricchisce grazie all'introduzione degli *antidiabetici orali* (1955), mentre la scoperta e l'impiego dei *contraccettivi* (1956) rende per la prima volta nella storia l'umanità in grado di controllare le nascite.

Anche malattie neurologiche ritenute inguaribili (come il morbo di Parkinson) si giovano dell'introduzione in terapia della L-Dopa (1960), in grado di contrastare gli effetti devastanti del male. Iniziano a essere impiegati anche i primi diuretici e i primi β -bloccanti ad azione ipotensiva e cardioprotettiva. Il ricorso sistematico agli antielmintici, la scoperta e l'uso di nuove vitamine, la diffusione della vaccinazione antipoliomielitica, l'estensione dell'impiego di preparati chemioterapici nella lotta ai tumori portano a un graduale progressivo miglioramento nella terapia di molte forme patologiche.

In questo apparentemente inarrestabile processo di "progresso" farmaceutico e di "ottimismo" medico, nel 1960 il dramma e il clamore che suscita nel mondo il "caso talidomide" (un farmaco ad azione ipnotica messo in commercio da un'industria tedesca come assolutamente sicuro ma che, assunto in gravidanza, determina la nascita di bimbi affetti da una gravissima malformazione: la focomelia) provocano una brusca battuta d'arresto e una

salutare pausa di riflessione sull'uso e sulla sicurezza dei farmaci (vedi **CD**: Approfondimento 2.4. *Il caso talidomide*). Diventa evidente la necessità di creare una legislazione nuova, intesa a promuovere una corretta sperimentazione farmaceutica e clinica dei farmaci, onde garantire l'assenza di gravi effetti collaterali e la presenza di una reale efficacia terapeutica dei medicinali messi in commercio. Si ridimensiona in tal modo anche il potere dilagante e non sufficientemente controllato dell'industria farmaceutica, una delle ragioni – assieme alle nuove conoscenze scientifiche acquisite in quegli anni in ambito farmacologico – dell'"esplosione farmacoterapica".

Se l'industria, grazie ai suoi capitali economici e umani, è un motore importante della ricerca farmacologica, è soprattutto grazie all'opera paziente e costante degli scienziati dentro le università e le istituzioni pubbliche che vengono tracciate le linee guida dell'attuale ricerca farmacologica. In particolare la farmacologia dei mediatori chimici, delle ammine e dei peptidi biologici, degli oppioidi endogeni (encefaline e endorfine), la farmacologia cellulare e subcellulare, la farmacologia dei processi immunitari e del sistema nervoso centrale, di quello endocrino.

Così, accanto alla tradizionale farmacologia *teorica* e *sperimentale*, è andata nascendo una nuova farmacologia *clinica*, intesa come scienza applicativa per un uso razionale del farmaco in ambito sanitario, che ha nella *farmacovigilanza* (attenta a scoprire gli effetti collaterali negativi dei farmaci), nella *farmacoepidemiologia* (intesa come valutazione quantitativa sull'uso e sull'abuso dei farmaci) e nella *farmacoeconomia* (intesa come rapporto costi-benefici, soprattutto per quanto riguarda la spesa pubblica) le sue principali espressioni.

Molti farmaci innovativi vengono scoperti e commercializzati negli ultimi decenni del Novecento: anti- H_2 , come la cimetidina (1972), e inibitori della pompa protonica, come l'omeprazolo (1994) e i suoi derivati, attivi nell'ulcera peptica; immunosoppressori, come la ciclosporina, e antivirali, come l'aciclovir (1984); nuovi calcio-antagonisti, ACE-inibitori, agonisti dell'angiotensina II per il controllo della pressione arteriosa e la cardioprotezione; statine (1989) per il controllo delle ipercolesterolemie familiari; antiprostatici, come la finasteride (1993); antiemcranici selettivi, come i triptani (1994); più efficaci e sicuri antidepressivi, come gli inibitori del reuptake della serotonina (SSRI) (1992), e antipsicotici innovativi, come la clozapina e il clopentixolo (1996). Queste molecole, spesso capostipiti di nuove classi di farmaci, dovrebbero (il condizionale è d'obbligo) essere il frutto non solo di un'attenta ricerca, ma anche di una più accurata valutazione del rapporto tra rischi e benefici.

Il farmaco infatti ha sempre, accanto a un'azione benefica, anche un'azione dannosa sull'organismo nel quale viene introdotto: è solo un'attenta valutazione del rapporto rischio/beneficio che ne deve guidare l'uso in ambito clinico, distinguendo tra *azione farmacologica* (cioè interazione biochimica con l'organismo, non sempre automaticamente "curativa" o "benefica") e *azione terapeutica* (vale a dire la capacità del prodotto di intervenire sulle cause della malattia – ad esempio distruggendo agenti patogeni quali

i microbi – consentendo la guarigione e/o, in alternativa, sopprimendo le manifestazioni sintomatologiche delle forme morbose, riducendo il dolore e migliorando realmente la qualità della vita del malato).

L'era biotecnologica

L'impatto delle nuove tecnologie

Negli ultimi decenni l'impiego in medicina e in farmacologia di *tecnologie informatiche* e di *tecniche biologiche* ha aperto strade innovative, offrendo opportunità di grande interesse speculativo e applicativo. L'informattizzazione e le tecnologie biomediche, intersecandosi a più riprese lungo la loro parallela evoluzione con la tradizionale chimica biologica e farmacologica, hanno cambiato sia il modo di pensare che di lavorare in ambito medico-farmacologico.

Sino a qualche decennio fa l'approccio tradizionale dei farmacologi era basato esclusivamente sullo studio e sulla comprensione dei meccanismi fisiologici e patologici, mentre l'identificazione di possibili agenti terapeutici si basava su modelli animali come sistema rivelatore. La ricerca farmacologica era caratterizzata da programmi di screening effettuati su grandi raccolte (dette "biblioteca chimica" o *library* in inglese) di molecole ottenute per sintesi chimica per verificarne l'affinità nei confronti di specifici target biologici e valutarne l'efficacia terapeutica, mentre l'uso delle poche proteine disponibili come potenziali farmaci era limitato dalla necessità di ricorrere a tecniche di estrazione da sorgenti di origine naturale. I modelli animali utilizzati sino agli anni Sessanta del Novecento erano costituiti quasi totalmente da patologie indotte da agenti fisici, chimici o biologici e in un piccolo numero di patologie animali spontanee. Scopo primario del modello animale era quello di evidenziare un effetto favorevole (di natura fisiologica e/o istologica) sulla patologia indotta. Nei decenni successivi furono introdotte tecniche che consentivano di generare *animali transgenici* (animali in cui venivano introdotti uno o più geni eterologhi) dotati di caratteristiche tali da renderli utilizzabili, nel versante della ricerca, come perfetti modelli sperimentali di patologie specifiche o, nel versante della produzione, come fornitori naturali della proteina codificata dal gene inserito.

Negli ultimi tre decenni del Novecento l'approccio farmacologico diretto in vivo, grazie alle conoscenze relative agli enzimi e ai recettori immagazzinate attraverso sistemi informatici, iniziava a trasformarsi in un approccio che utilizzava metodologie in vitro, rese ancora più veloci e potenti attraverso sistemi di elaborazione informatica dei dati.

L'ingegneria genetica: dal DNA ricombinante al Progetto Genoma Umano

La scoperta della struttura a doppia elica del DNA effettuata nel 1953 da James D. Watson e Francis H. C. Crick, vincitori del premio Nobel nel 1962, diede inizio a un processo di conoscenze che, in breve tempo, consentì di

comprendere i meccanismi biochimici e molecolari che erano alla base del funzionamento del codice genetico degli organismi viventi. Nel giro di pochi decenni la *biologia molecolare* è divenuta il principale elemento di un rivoluzionario cambiamento della medicina e della farmacologia.

Negli anni Sessanta, mentre si completava il quadro di conoscenze empiriche sul codice genetico, s'iniziò a immaginare la possibilità di utilizzare alcuni meccanismi biochimici che consentivano ai batteri di riparare errori di replicazione o di salvaguardare la specie-specificità del materiale ereditario, per costruire artificialmente sistemi in grado di "manipolare" l'informazione genetica. Vennero così messe a punto e commercializzate procedure operative di *ingegneria genetica* per ricombinare i geni, replicarli mediante clonazione e caratterizzarli sulla base della sequenza specifica delle basi nucleotidiche. L'impiego delle tecniche di "DNA ricombinante" (1973) apriva in ambito farmacologico prospettive nuove e interessanti, quale la possibilità di produrre molecole complesse come le proteine, la cui sintesi è nella maggior parte dei casi impraticabile per via chimica. Sino ad allora i farmaci in commercio era costituiti, oltre che da molecole derivate da sintesi chimica (che ancora oggi rappresentano la maggior parte dei composti farmaceutici), da prodotti di origine naturale contenenti molecole molto complesse – tra le quali appunto le proteine – ottenute per estrazione da organi, tessuti o liquidi biologici animali (come l'insulina, da tessuti di maiale) o umani (come l'ormone della crescita, dall'ipofisi di cadaveri o le gonadotropine, dalle urine di donne gravide o in menopausa).

In ambito farmacologico questa nuova "tecnologia biologica" o *biotecnologia* era destinata a provocare una "rivoluzione" simile a quella innescata a metà Ottocento dalla nascita dei farmaci di sintesi. Dal punto di vista epistemologico le biotecnologie provocarono un analogo terremoto anche in campo medico. La scoperta e il riconoscimento delle alterazioni genetiche all'origine delle manifestazioni patologiche, oltre a chiarire i meccanismi eziopatogenetici di molte affezioni morbose, apriva la strada a una nuova affascinante possibilità: guarire una malattia introducendo nell'organismo geni in grado di curare le cellule portatrici di geni difettosi, realizzando così una precisa e mirata *terapia genica*.

Sotto la spinta di queste potenzialità terapeutiche che esigevano come presupposto per il successo la precisa conoscenza analitica del corredo cromosomico umano con il suo patrimonio genetico, nel 1990 prese avvio un'impresa internazionale mirante a sequenziare l'intero genoma. Il *Progetto Genoma Umano* ha mobilitato migliaia di scienziati e di laboratori di ricerca pubblici e privati in tutto il mondo che nel 2001 sono giunti alla sua quasi completa decodificazione.

La decifrazione del genoma umano ha fornito indicazioni biologiche di non univoca interpretazione, ma ha aperto la strada ad applicazioni farmacologiche straordinarie. La conoscenza di ogni singolo gene permette in teoria di identificarne la proteina prodotta, anche se è verosimile che l'assunto "un gene = una proteina" non sia

del tutto veritiero, poiché è probabile che, a seguito di eventi post-translazionali, dalla proteina codificata da un singolo gene se ne possano generare altre. Tuttavia sulla scorta di queste conoscenze è possibile valutare la funzionalità della singola proteina prodotta dal gene e, una volta definita, decidere quale sia il suo migliore utilizzo farmacologico: come target per piccole molecole, come target di un anticorpo specifico o come agente terapeutico di per sé.

Chimica combinatoriale e bioinformatica

Grandi cambiamenti hanno interessato le modalità di ricerca, progettazione, analisi e produzione dei farmaci. Solitamente il farmacologo per ricercare nuove sostanze medicinali analizzava prodotti naturali oppure realizzava sintesi razionali di composti in grado di legarsi con il target biologico prescelto, modificandone poi in laboratorio la struttura chimica per renderli più affini ai recettori sui quali dovevano agire o migliorarne la risposta terapeutica.

Questo approccio tradizionale è stato prima integrato e poi sostituito con le tecniche di modellistica molecolare informatica: grazie all'uso di computer e di programmi mirati, oggi un farmaco, prima di essere materialmente prodotto, viene progettato e studiato virtualmente (*Computer Drug Modeling* o *Computer-Aided Drug Design*). Questa modalità di lavoro consente di ottimizzare la struttura di composti atti a interagire con bersagli selezionati e di eliminare già nelle fasi iniziali dello studio quelle molecole candidate farmaco (*lead compound*) che, utilizzando un approccio tradizionale, rischierebbero di essere scartate per problemi di assorbimento, di distribuzione, di metabolismo, di escrezione o di tossicità solo in fasi già avanzate della ricerca e della sperimentazione, con ampio spreco temporale e grave danno economico (Figura 2.7).

Gli approcci informatici rappresentano un promettente mezzo che, partendo da dati biologici e fisico-chimici, consente di realizzare l'ottimizzazione strutturale di composti atti a interagire con bersagli selezionati. Nello stesso modo gli algoritmi dell'assorbimento, della distribuzione, del metabolismo, dell'escrezione e della tossicità (*ADMET bioactivity*) potrebbero servire a eliminare prima molecole candidate problematiche. Un tale screening di "composti virtuali" è probabilmente più veloce ed economico dei tradizionali metodi chimici "umidi": un vantaggio per un'industria come quella farmaceutica che soffre dell'aumento dei costi di sviluppo.

Negli ultimi vent'anni l'avvento della *chimica combinatoriale* ha rappresentato un'ulteriore importante svolta nel modo di far ricerca farmacologica nei laboratori dell'università e dell'industria. Costruendo collezioni di numerosi prodotti (biblioteca o *library*) con un alto numero di varianti della struttura fondamentale testandone poi sistematicamente l'attività biologica diventa possibile aumentare moltissimo la probabilità di scoprire molecole attive nei confronti del target desiderato. Ciò è reso possibile grazie all'uso di metodi di screening rapido automatizzato (*High Throughput Screening* o *HTPS*) che si avvalgono di sistemi di elaborazione informatica e di tecniche robotiche. I composti che si mostrano dotati di attività biologica vengono poi ulteriormente e più a fondo studiati, mentre tutti gli altri sono scartati.

Questo nuovo approccio della ricerca ha fatto nascere vere e proprie industrie specializzate nella produzione di vasti archivi di molecole ottenute con la chimica combinatoriale, come la Pharmacoepia (1993) e l'Affymax (1994).

Ricerca virtuale dei farmaci e screening rapido automatizzato di prodotti realizzati con la chimica combinatoriale sono le nuove frontiere della *bioinformatica chimica*, la scienza che insieme alla *bioingegneria genetica* rappresenta la strada della ricerca farmacologica futura (Figura 2.8).

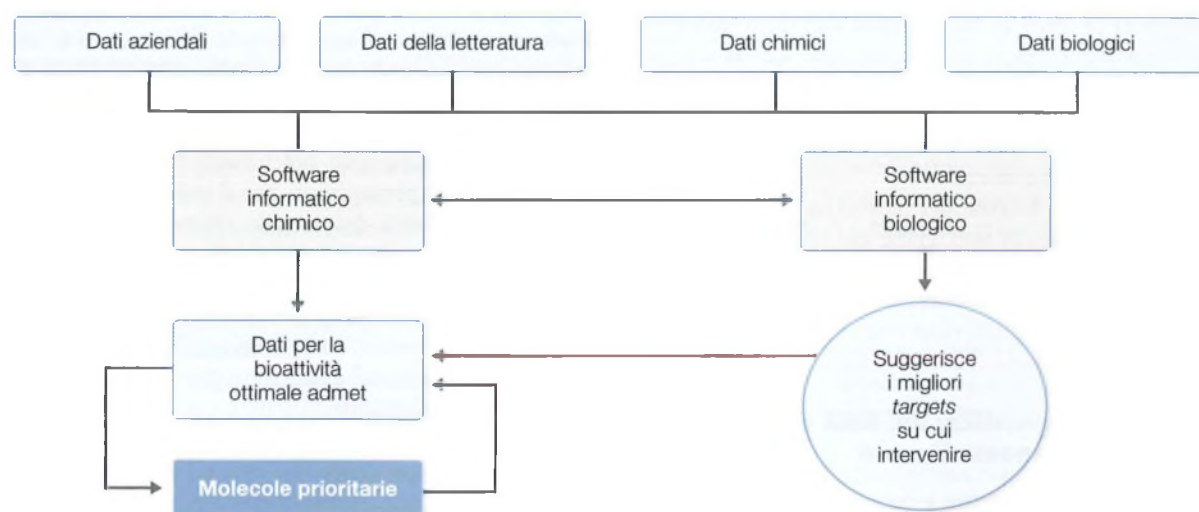


FIGURA 2.7 Scoperta virtuale dei farmaci. (Da: Gershell e Atkins, 2003, modificata)

I farmaci biotecnologici e le prospettive della farmacologia

Nel 1982 l'approvazione e la registrazione negli USA dell'insulina umana prodotta con la tecnica del DNA ricombinante dalla Genetech, capostipite delle industrie biotecnologiche – *biotech companies* – e destinata a diventare il principale esempio del nuovo modello di sviluppo economico-industriale in campo farmaceutico, segnava l'inizio "ufficiale" della produzione dei farmaci biotecnologici.

La storia farmacologica di questa nuova "era biotecnologica" mostra tappe significative. Tra l'inizio degli anni Ottanta e la fine degli anni Novanta lo sforzo è stato indirizzato a rimpiazzare le proteine naturali impiegate in terapia con proteine ottenute da cellule geneticamente manipolate. L'insulina naturale, ricavata dal pancreas del maiale, era rimpiazzata da insulina umana ottenuta trasferendo in batteri lo specifico gene. Le gonadotropine, estratte da urine di donne gravide o in menopausa, venivano sostituite con proteine ricombinanti ottenute da cellule di ovaio di roditore ricombinate con i geni umani degli ormoni proteici. Interferone ricombinante era usato in luogo di quello estratto da fibroblasti.

Grazie all'ingegneria genetica venivano così prodotti numerosi *farmaci biologici* come insulina, ormone della crescita, eritropoietina, fattore VIII della coagulazione, gonadotropine, inibitori del plasminogeno, interleuchina-2, interferone alfa e beta, "farmaci antisense" (*antisense drugs*).

Dagli anni Novanta a oggi la potenzialità offerta dalla conoscenza del genoma umano di identificare nuove proteine di interesse farmacologico ha aumentato l'attenzione dei farmacologi e dei ricercatori per le proteine secrete (quelle che entrano in circolo, diverse da quelle che costituiscono la struttura dell'organismo). Questo fatto ha determinato un confronto tra nuove tecnologie biologiche e tradizionali tecniche di ricerca chimica. All'universo delle infinite strutture chimiche possibili si è contrapposto l'universo delle proteine derivabili dalla conoscenza della funzionalità dei geni.

Queste nuove opportunità tecnologiche e scientifiche hanno aperto la porta al seducente mondo degli "omics", come lo definisce la letteratura scientifica internazionale. L'identificazione e la classificazione del comparto genetico (*genomics*) e del comparto proteico (*proteomics*) consentono di sviluppare programmi di ricerca particolari. Scoprire geni di potenziale interesse terapeutico è stato reso possibile dall'uso informatizzato di particolari microchip biologici (come quelli messi a punto dall'Affimetrix, industria pioniera in ambito genomico). Altri studi sono finalizzati a individuare le proteine normali di un tessuto sano e quelle anomale di un tessuto patologico. Queste ultime, associate a determinate patologie, possono essere studiate per diventare possibili marcatori diagnostici o agenti terapeutici. La *genomica* e la *proteomica* hanno ribaltato il paradigma della ricerca farmacologica. L'approccio tradizionale che portava dalla patologia al target, dal target allo screening e dallo screening alla molecola, si è capovolto: oggi si

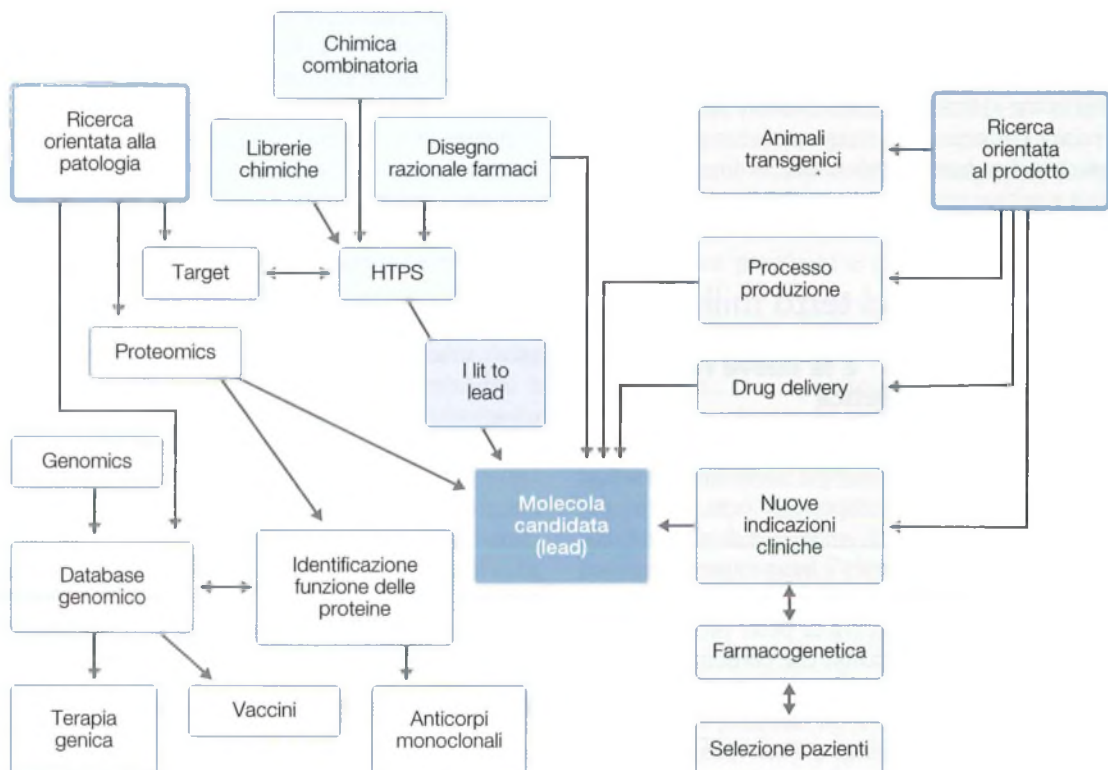


FIGURA 2.8 Le principali linee di ricerca di un nuovo farmaco. (Da: Fumero S, 2003, modificata)

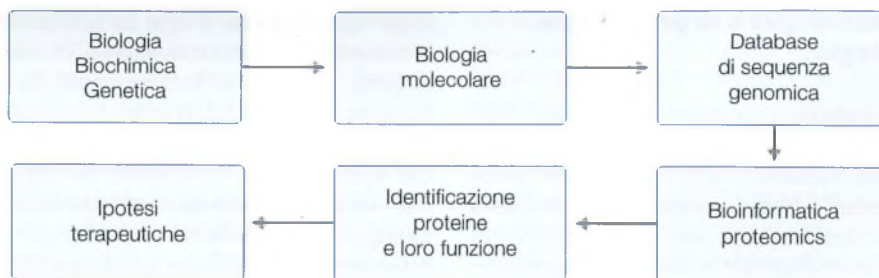


FIGURA 2.9 Il nuovo paradigma della ricerca farmaceutica nell'era biotecnologica. (Da Fumero S, 2003, modificata)

passa dal gene alla proteina, dalla proteina allo screening della sua funzione e dalla funzione al candidato farmaco (Figura 2.9).

La farmacopea del futuro vedrà, accanto alla terapia genica, l'impiego crescente dei farmaci biotecnologici come gli anticorpi monoclonali (la cui tecnica di produzione venne messa a punto nel 1975 da Georges J. Kohler e César Milstein, vincitori del premio Nobel nel 1984) assai attivi contro alcune neoplasie e i nuovi vaccini.

Anche lo studio della risposta clinica ai farmaci ha potuto avvalersi degli studi informatici e genetici. Le tecniche di *drug delivery* hanno subito importanti innovazioni tecnologiche. Accanto alle tradizionali compresse, alle capsule, alle supposte, alle iniezioni intramuscolari o alle infusioni venose i farmaci vengono ora somministrati con sistemi più sofisticati: spray nasali, cerotti transdermici, capsule, formulazioni liofilizzate orali, compresse a rilascio ritardato (attraverso dispositivi osmotici) o controllato (come la "pegilazione" – combinazione della sostanza farmacologica con polietilene glicole – o l'uso di liposomi come veicolanti). Ciò consente un'assunzione più precisa e costante del principio attivo, come gli studi di *farmacocinetica* hanno evidenziato, al fine di ottenere il miglior risultato terapeutico possibile.

La farmacologia del terzo millennio

Il mondo degli "omics" e le nuove regole dell'industria farmaceutica

In questi ultimi anni lo studio delle variazioni genetiche individuali ha consentito di comprendere meglio i fattori che possono influenzare la risposta di ogni singolo paziente ai farmaci. Gli studi di *genomica* e di *proteomica* (il cosiddetto mondo degli "omics") hanno aperto orizzonti di conoscenza strabilianti. Oggi la *farmacogenomica* si propone l'ambiziosa prospettiva di poter predire (grazie a tecnologie basate su *microchips* che consentono rapide indagini molecolari su specifici genotipi) la risposta individuale di un paziente a un farmaco, in modo da valutarne l'eventuale resistenza o l'insorgenza di effetti collaterali significativi, arrivando a ipotizzare l'impiego di un farmaco "su misura" per quel particolare soggetto. Questa nuova farmacologia ha cambiato e sta tuttora

cambiando anche le regole dell'industria farmaceutica e del suo mercato.

Nell'arco di vent'anni gli investimenti che un'industria deve affrontare per sviluppare un nuovo farmaco sono passati da 80 a 800 milioni di dollari, mentre il tempo che si deve attendere prima che un nuovo prodotto venga messo in commercio è slittato da 10 a quasi 15 anni. Questa è stata forse la principale ragione che, negli ultimi quindici anni, da un lato ha provocato la scomparsa – per assorbimento da parte di altre o per mancanza di competitività – di molte industrie del settore e dall'altro ha favorito la fusione fra aziende (*merger*) che ha generato veri e propri giganti farmaceutici i quali, anche se in piccolo numero, sono in grado di controllare e condizionare ricerca e mercato a livello mondiale (*big pharma*). Dalla fusione di industrie che già in precedenza si erano accorpate sono così nate, solo per citarne alcune, Novartis da Ciba-Geigy e Sandoz, Aventis da Hoechst e Roussel-Rhone Poulenc-Rorer, Gsk da Glaxo Wellcome e SmithKline.

Accanto a queste enormi maxindustrie, lo sviluppo del fenomeno biotecnologico ha favorito la creazione e la proliferazione, soprattutto inizialmente negli Stati Uniti, sede di origine del fenomeno, poi anche in Europa, di migliaia (circa 200 in Italia) di laboratori di ricerca di piccole dimensioni o di minuscole aziende basate su pochi progetti promettenti dal punto di vista biofarmacologico in grado di attrarre capitali privati per consentirne la realizzazione (*biotech companies*). Sono aziende che hanno preso origine separandosi da un'industria più grande o dall'università (*spin-off*), oppure società fondate da un gruppo di ricercatori-imprenditori per elaborare un progetto nuovo (*start-up*).

I nuovi farmaci nasceranno quindi sia nei vasti laboratori nati dalla concentrazione delle medie e grandi industrie farmaceutiche tradizionali, sia nei più esigui studi delle piccole e dinamiche aziende biotecnologiche che hanno beneficiato del successo del loro progetto e del fallimento delle concorrenti in un mercato che non ammette errori.

Nanotecnologie e farmaci molecolari

La manipolazione della materia a livello molecolare e atomico (cioè con una scala dimensionale inferiore al micrometro, vale a dire tra 1 e 100 nanometri) è l'ambito nel quale operano le nanotecnologie. In questo

nanomondo non esistono più confini fra chimica, fisica, ingegneria, matematica e biologia. L'ambito di investigazione di questa nuova scienza non può che essere multidisciplinare. Le proprietà che la materia assume a dimensioni nanometriche rendono complesse la costruzione e la sperimentazione di nanodispositivi, che però possono fornire prestazioni straordinarie. L'applicazione medica di queste particolari tecnologie ha dato vita alla nanomedicina: un settore innovativo destinato ad avere un impatto rivoluzionario in ambito diagnostico e terapeutico. In particolare di quest'ultimo settore si occupa la *nanofarmacologia*, che utilizza nanoparticelle (vettori) per realizzare nanofarmaci dotati di caratteristiche farmacocinetiche e di potenzialità farmacoterapeutiche impossibili per farmaci di grandezza superiore al micrometro.

Questi nanofarmaci sono in grado di agire su bersagli molecolari in modo esclusivo e selettivo (come avviene ad esempio nella farmacologia dell'RNA) e di esplicitare proprietà farmacologiche peculiari: come la possibilità di inglobare un'elevata quantità di farmaco, che è possibile veicolare direttamente sul tessuto malato e nelle cellule patologiche (ad esempio nei tumori), e di consentire, grazie alla maggiore solubilità, una più prolungata esposizione al farmaco; oppure la possibilità di rilasciare contemporaneamente più farmaci, contenuti nella stessa nanoparticella, grazie a farmacocinetiche differenti e appropriate; o ancora la possibilità, utilizzando questi nanovettori, di far attraversare senza difficoltà ai farmaci la barriera ematoencefalica, la membrana cellulare e il citoplasma, in modo da raggiungere facilmente i *target* terapeutici.

Diverse metodiche (impiego di liposomi convenzionali o stabilizzati – pegilati con microsfele o nanoparticelle –, uso di polimeri o dendrimeri – molecole con numerosi “uncini” che ne permettono l'ancoraggio alle cellule –, microdispositivi con microchip – MEMS –) sono utilizzate per modificare la biodisponibilità dei farmaci nanomediati in modo da modulare la risposta terapeutica in funzione dei risultati che si vogliono ottenere.

Un'altra importante caratteristica dei nanofarmaci è rappresentata dalla *triggered response* (letteralmente “risposta comandata”), cioè dal fatto che essi possano iniziare ad agire solo in risposta a uno specifico segnale attivatore (come ad esempio l'influsso di un campo magnetico) che consenta alle nanoparticelle di rilasciare localmente il farmaco quando esse hanno raggiunto il proprio bersaglio dentro l'organismo del malato.

Le nanotecnologie rappresentano dunque, in ambito medico e farmacologico, la via privilegiata per dare corpo a quella medicina personalizzata alla quale aspira la sanità del nuovo millennio e per realizzare quella farmacologia individualizzata a cui tende l'approccio terapeutico del futuro.

La farmacologia di genere: farmaci maschili e femminili

La constatazione che uomini e donne si ammalano in maniera diversa, cioè che la biologia maschile e quella femminile (non limitata ovviamente sole alle differenze degli organi genitali) influenzano in modo differente lo stato di salute, il decorso delle malattie e la risposta alle cure, ha fatto nascere, una quindicina d'anni fa, la *medicina di genere*. È una disciplina che studia l'influenza del sesso sulle malattie con l'obiettivo di arrivare a formulare terapie più appropriate e personalizzate. Sulla scorta di queste indagini si è sviluppata anche una *farmacologia di genere*, per studiare se e come le risposte ai trattamenti farmacologici sono diverse tra uomo e donna, tenendo in considerazione le variazioni fisiologiche che avvengono nella donna in funzione della ciclicità della vita riproduttiva, dell'età e dell'uso di associazioni estro-progestiniche. Si arriverà forse in tal modo a realizzare appositi farmaci maschili e femminili anche per una stessa patologia, in modo da fornire a ciascun genere una terapia mirata, specifica e parimenti efficace.

In effetti, sino a pochi anni fa, la maggior parte delle patologie e delle relative terapie erano studiate quasi esclusivamente per e nell'uomo. Anche le sperimentazioni cliniche sugli effetti di un nuovo farmaco sono state condotte quasi esclusivamente su maschi giovani, meno su soggetti femminili (per motivi di sicurezza legati soprattutto alle possibili gravidanze) con errori o comunque incompletezza di valutazione. Il problema diventa ancora più complesso se, oltre al genere, si tiene conto dell'età, altro elemento di non poco conto nella sperimentazione farmacologica e clinica, poiché normalmente bambini e anziani – pur avendo una risposta biologico-clinica differente dalle persone adulte di media età – non hanno farmaci appositamente studiati e testati per loro.

Diventa dunque indispensabile ipotizzare una *farmacologia di età* in grado di trovare bioindicatori specifici nella varie fasi della vita, modelli sperimentali più appropriati per la ricerca preclinica e gruppi più omogenei nella ricerca clinica che tengano conto delle differenze di età oltre che di genere. Farmaci genere-specifici e farmaci età-correlati sono ulteriori tappe di quella *farmacologia personalizzata* che rappresenta la nuova frontiera della ricerca farmacologica del terzo millennio.

La brevissima storia dei farmaci qui riportata fa da cornice ai capitoli di questo libro che riportano le maggiori conquiste farmacologiche ottenute negli ultimi anni e danno le linee di ricerca clinica e sperimentale verso le quali si muove la farmacologia del futuro.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I farmaci che si utilizzano oggi per curare le malattie sono prodotti efficaci e il cui profilo, in linea di massima, è supportato dai dati della ricerca scientifica.
- ▶ Per molti secoli la medicina non ha avuto a disposizione sostanze in grado di incidere realmente sul decorso di una patologia, modificandone la storia clinica naturale sino ad arrivare alla guarigione del malato, oppure riducendo o eliminandone i sintomi in quei casi in cui la terapia non poteva essere risolutiva.
- ▶ Solo poco più di un secolo fa la farmacologia è entrata realmente nella sua fase moderna di sviluppo e ha iniziato a produrre farmaci chimici validi.
- ▶ Lo sviluppo di un farmaco è un'impresa complessa che dipende molto dal progresso di diverse discipline anche distanti dalla farmacologia.

Bibliografia essenziale

- ▶ AA. VV. Il farmaco nei tempi. Volumi 1-4. Parma-Milano: Astrea/Farmitalia Carlo Erba, 1987-1992.
- ▶ Alberghina L, Lotti M (eds). Biotecnologie. Le Scienze. Quaderni n. 106, febbraio 1999.
- ▶ Benedicenti A. Malati, medici e farmacisti. Storia dei rimedi traverso i secoli e delle teorie che ne spiegano l'azione sull'organismo. Milano: Hoepli, 1924.
- ▶ Berti F, Chiesara E, Clementi F, Montorsi W, Sironi VA. Uomini e farmaci. La farmacologia a Milano tra storia e memoria. Bari: Laterza, 2001.
- ▶ Bovet D. Vittoria sui microbi. Storia di una scoperta. Torino: Bollati Boringhieri, 1991.
- ▶ Burbaum J, Tobal GM. Proteomics in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 2002;6:427-33.
- ▶ Corbellini G. Le grammatiche del vivente. Storia della biologia e della medicina molecolare. Bari: Laterza, 1999.
- ▶ Cosmacini G. L'arte lunga. Storia della medicina dall'antichità ad oggi. Bari: Laterza, 1997.
- ▶ Cosmacini G, Sironi VA. L'avvento della tecnologia in medicina. In: Marchis V (ed). Storia delle scienze. Vol. V. Conoscenze scientifiche e trasferimento tecnologico. Torino: Einaudi, 1995: 362-89.
- ▶ Franconi F, Montilla S, Vella S. Farmacologia di genere. Torino: SEEEd, 2010.
- ▶ Freitas RA Jr. What is nanomedicine? *Nanomedicine* 2005;1:2-9.
- ▶ Freitas RA Jr. Current status of nanomedicine and medical nanorobotics. *J Comput Theor Nanosci* 2005;2:1-25.
- ▶ Frigerio A. I farmaci dalla natura alle biotecnologie. Le Scienze. Quaderni n. 102, giugno 1998.
- ▶ Fumero S. Ricerca e sviluppo nell'industria biotecnologica e farmaceutica. Torino: Bollati Boringhieri, 2003.
- ▶ Gershell LJ, Atkins JH. A brief history of novel drug discovery technologies. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:321-7.
- ▶ Leake CD. An historical account of pharmacology to the 20th century. Springfield: Charles C. Thomas, 1975.
- ▶ Lindpaintner K. The impact of pharmacogenetics and pharmacogenomics on drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:463-9.
- ▶ Maehle AH, Prull CR, Halliwell RE. The emergence of the drug receptor theory. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:637-41.
- ▶ Nagle T, Berg C, Nassr R, Pang K. The further evolution of biotech. *Nat Rev Drug Discov*; 2003;2:75-9.
- ▶ Sironi VA. Le officine della salute. Storia del farmaco e della sua industria in Italia. Bari: Laterza, 1992.
- ▶ Sironi VA. Da speciali a imprenditori. Storia dei Recordati. Bari: Laterza, 1996.
- ▶ Sironi VA. I farmacisti: commercianti o professionisti? In: Varni A (ed). Storia delle professioni in Italia tra Ottocento e Novecento. Bologna: Il Mulino, 2002: 77-89.
- ▶ Sironi VA. Ospedali e medicinali. Storia del farmacista ospedaliero. Bari: Laterza, 2007.
- ▶ Sironi VA. Il farmaco: un protagonista poliedrico della scena terapeutica, introduzione a Fainzang S. Farmaci e società. Il paziente, il medico e la ricetta (edizione italiana a cura di Sironi VA, Tognetti Bordogna M.). Milano: FrancoAngeli, 2009: 13-24.

Ricerca preclinica e sviluppo di nuovi farmaci

CAPITOLO

3

Ennio Ongini

Obiettivi formativi

- Comprendere il percorso scientifico e tecnologico che ha guidato la scoperta e lo sviluppo dei farmaci attualmente in uso e che permetterà di identificare nuovi farmaci efficaci e sicuri
- Acquisire le nozioni di base sulla ricerca farmaceutica, i fattori che determinano la scelta di un progetto e dell'area terapeutica, l'importanza delle conoscenze sui meccanismi molecolari delle malattie, il contributo delle nuove tecnologie, la necessità di un approccio multidisciplinare
- Acquisire conoscenze sul percorso di ricerca e sviluppo dei farmaci di origine chimica e dei farmaci biologici
- Comprendere le tappe più critiche nell'identificazione di composti biologicamente attivi, gli ostacoli da superare, l'importanza dei brevetti, della farmacocinetica, dello sviluppo preclinico (la formulazione, i saggi di tossicologia)

I farmaci hanno modificato in maniera radicale l'impatto di numerose malattie sui pazienti: una vera rivoluzione. Gli ultimi 60 anni sono sicuramente i più significativi. Sono stati migliorati farmaci scoperti in precedenza (ad esempio, antibiotici e analgesici) e sono emerse nuove classi di farmaci. Basti pensare agli psicofarmaci, i farmaci per l'ipertensione, per l'ulcera o per ridurre i livelli di colesterolo, gli immunosoppressori, gli antitumorali per citarne alcuni. Accanto ai rimedi ottenuti per estrazione da fonti naturali oppure grazie alla chimica farmaceutica, negli ultimi 30 anni sono stati sviluppati i cosiddetti farmaci "biologici": proteine terapeutiche, anticorpi monoclonali. Ulteriori innovazioni sono all'orizzonte.

La scoperta di nuovi farmaci è conseguenza sia del grande progresso tecnologico e scientifico, sia degli enormi investimenti in ricerca dell'industria farmaceutica (vedi CD: Approfondimento 3.1. *Il contributo significativo dei piccoli gruppi di ricerca (start-up e spin-off)*). L'identificazione e il successivo sviluppo di nuove molecole richiedono ingenti risorse (sia come numero di ricercatori che in termini di disponibilità finanziaria che consenta apparecchiature/tecnologie all'avanguardia) e tempi lunghi, da 10 a 15 anni. Il rischio di fallimento è elevato: può emergere, dopo anni di impegno, che l'attività farmacologica non soddisfi le aspettative e gli effetti collaterali non siano accettabili; ma si può anche arrivare troppo tardi perché altri gruppi di ricerca hanno nel frattempo identificato molecole migliori. Il "cimitero" dei farmaci è enorme: qui giacciono le cosiddette molecole "sommerse", magari molto efficaci

nei modelli di malattia, ma aventi biodisponibilità che li rendono inutilizzabili; altri abbandonati per l'emergere di problemi tossicologici, per la disponibilità di farmaci con migliori caratteristiche o per cambi di strategie o difficoltà, soprattutto finanziarie, della stessa industria farmaceutica.

Innovazione tecnologica e conoscenze scientifiche nella ricerca farmaceutica moderna

Con la rapida crescita delle scoperte scientifiche e delle tecnologie disponibili sono avvenute profonde modifiche nel modo di fare ricerca (Figura 3.1). Si possono identificare alcune tappe importanti di questo percorso, coincidenti con alcune pietre miliari nelle acquisizioni di conoscenze scientifiche biomediche. Gli anni 50 e 60 del secolo scorso furono caratterizzati da uno sforzo intenso per identificare principi attivi naturali, provenienti sia dal mondo animale che da quello vegetale. Grazie alle sempre maggiori competenze in chimica e alla disponibilità di apparecchiature scientifiche sofisticate, i componenti dotati di attività biologica venivano isolati con tecniche di estrazione. Negli anni a seguire, partendo dal principio attivo inteso come prototipo, vennero sintetizzati numerosi composti derivati la cui attività biologica era valutata attraverso lo *screening* nei modelli in vitro (ad esempio, organi isolati) o in vivo (ad esempio, trattamento di animali da laboratorio), al fine di selezionare molecole da avviare allo sviluppo. In pochi

anni il nuovo farmaco si metteva a disposizione dei pazienti (ad esempio, l'ansiolitico diazepam, Valium®, venne approvato per l'uso dopo 4 anni dalla sintesi, avvenuta nel 1959). La tragedia del talidomide (un farmaco sedativo e antinausea usato durante la gravidanza, che indusse gravi effetti collaterali e responsabile di migliaia di casi di bambini focomelici) negli anni 60 portò all'adozione in molti Paesi di normative restrittive per l'approvazione di nuovi farmaci, modificandone in maniera sostanziale il percorso di sviluppo. Gli studi di tossicologia divennero una fase importante e critica, la farmacologia clinica crebbe di importanza e di peso e si cominciò a definire con maggiore precisione il percorso necessario per la sperimentazione di nuovi farmaci sull'uomo (studio nei volontari, uso del placebo, fasi ben distinte della ricerca clinica ecc.). Come conseguenza di tali cambiamenti, i costi di ricerca e sviluppo cominciarono a crescere in modo significativo e i tempi per arrivare all'approvazione di nuove molecole si dilatarono notevolmente.

All'inizio degli anni 80 si verificò un altro passaggio fondamentale. Le tecnologie e le conoscenze rese disponibili dalla biologia molecolare consentirono di elaborare nuove ipotesi sui meccanismi alla base delle malattie e nuovi obiettivi (*target*) biologici vennero identificati, a livello molecolare, per la ricerca di farmaci. In parallelo, proteine umane di interesse farmacologico (ad esempio, insulina, interferone- α , ormone della crescita) furono prodotte in grande quantità usando le tecniche del DNA ricombinante e introducendo geni specifici in microrganismi semplici quali l'*Escherichia coli*: un grande successo rispetto alla possibilità di ottenere proteine animali con tecniche estrattive (ad esempio, insulina di maiale). Grazie alle biotecnologie divenne così possibile inserire frammenti di DNA umano in organismi produttori (*Escherichia coli*, lievito, linee cellulari di mammifero) e ottenere il composto di interesse in grandi quantità ed elevata purezza. Nello stesso periodo iniziarono le ricerche sull'uso di anticorpi monoclonali in terapia: una strada innovativa che ha poi avuto un riscontro terapeutico sempre crescente.

Negli anni 90 avvennero altri profondi cambiamenti che portarono a quelle competenze e tecnologie disponibili oggi nei laboratori più avanzati. Innanzitutto ci fu la ricaduta del "Progetto Genoma", un programma internazionale che portò al sequenziamento non solo del genoma umano ma anche di organismi più semplici, dai microrganismi procarioti (ad esempio, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*) a eucarioti quali i lieviti (ad esempio, *Saccharomyces cerevisiae*), fino al nematode *Caenorhabditis elegans* e al topo di laboratorio. L'industria farmaceutica si organizzò rapidamente per avere accesso e utilizzare le sequenze geniche sia tramite collaborazioni con centri di ricerca esterni sia tramite formazione dei ricercatori all'interno dei propri laboratori. Si iniziò a parlare di "genomica medica", una nuova disciplina per identificare strumenti diagnostici innovativi e scoprire nuovi farmaci (vedi Capitolo 19). Dalle conoscenze di genetica nacquero anche altri approcci terapeutici su cui si è investito parecchio. Fra questi merita attenzione la terapia genica, sia per gli investimenti che per le aspettative che ha generato (vedi Capitolo 54).

Assieme alla genetica entrarono nei laboratori, in maniera rapida, altre competenze quali la "bioinformatica". Esperti in computer in grado di gestire le banche dati di genetica, confrontare le sequenze, trovare omologie, i bioinformatici danno un contributo determinante per l'applicazione delle conoscenze che emergono in questo settore in rapida evoluzione. Il confronto fra DNA e proteine umane e di altri organismi, quali batteri o funghi, nei tessuti sani e in situazioni patologiche ha consentito così di identificare numerosi meccanismi su cui investire nuove strategie di ricerca. Così, il numero dei *target* biologici di interesse per la ricerca di nuovi farmaci è aumentato in maniera significativa.

I rapidi progressi dell'informatica e la disponibilità di computer sempre più potenti hanno fornito un supporto notevole per i ricercatori, dall'identificazione del *target* biologico fino alla selezione dei composti attivi. Una tecnologia che si è diffusa rapidamente nei laboratori di tutto il mondo negli anni 90 è stata l'*High-Throughput Screening*

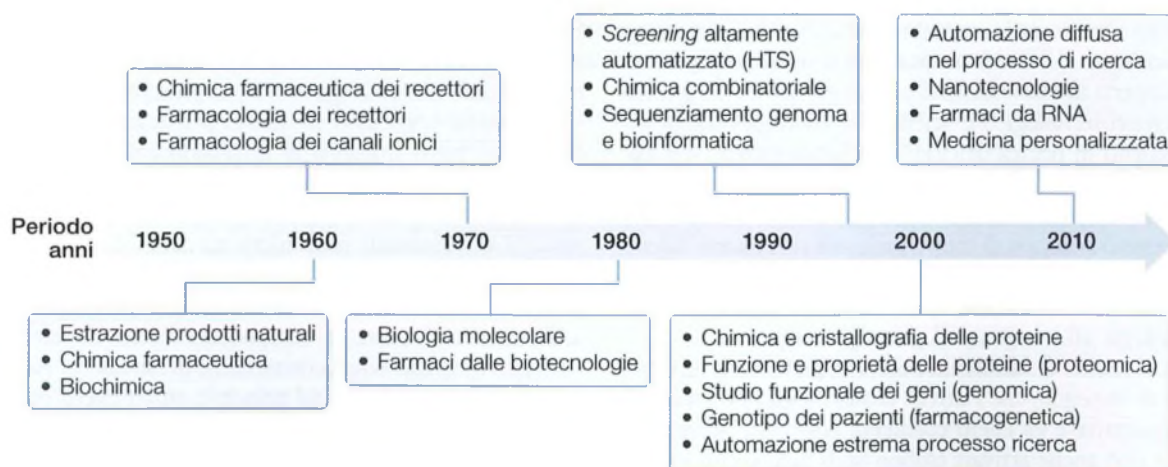


FIGURA 3.1 Con la rapida crescita delle conoscenze scientifiche e la disponibilità di tecnologie innovative sono avvenuti continui profondi cambiamenti nel percorso di ricerca di nuovi farmaci.

(HTS). Si tratta di sistemi altamente automatizzati che consentono di valutare rapidamente migliaia di composti chimici in saggi biologici utilizzando diversi metodi di rilevazione (ad esempio, fluorescenza, luminescenza). Solo i composti che mostrano un'attività al sistema di rilevazione sono ulteriormente considerati nella fase di *drug discovery* mentre gli altri vengono abbandonati (vedi **CD**: Approfondimento 3.2. *High-Throughput Screening*).

In parallelo sono stati sviluppati metodi per sintetizzare numerosi composti chimici (ad esempio, chimica combinatoriale). Con questo percorso ad alta tecnologia, che valuta un elevato numero di composti chimici, è fondamentale definire la validità dei *target* biologici, cioè accertarsi che si stia effettivamente valutando un passaggio critico del processo patologico su cui si vuole intervenire.

Nell'ultimo decennio, tuttavia, nonostante gli enormi investimenti in termini di innovazione tecnologica e di risorse finanziarie, non si è osservato un incremento rispetto al passato nel numero di nuovi farmaci che ogni anno raggiungono il mercato. I dati riguardanti le approvazioni da parte di FDA (*Food and Drug Administration*, autorità regolatoria USA deputata ad autorizzare la messa in commercio dei nuovi farmaci) sono chiari: i nuovi farmaci oscillano tra i 25-30 all'anno nonostante la continua crescita degli investimenti in ricerca e sviluppo (Figura 3.2). Il risultato deludente ha stimolato di recente approcci più completi e integrati. Così, anziché focalizzarsi solo su un *target* biologico isolato dal contesto (ad esempio il recettore o l'enzima) si studia il processo patologico nella sua complessità valutando gli effetti sulla cellula e sui tessuti. Con l'obiettivo di poter intervenire sui processi responsabili della malattia, l'HTS è stato modificato per studiare direttamente la cellula completa e non solo un passaggio biochimico isolato mentre l'analisi dell'immagine sempre più sofisticata e sensibile, consente di misurare alcuni segnali intracellulari. È in questo contesto multidisciplinare che oggi si stanno accumulando competenze sempre maggiori sui complessi meccanismi molecolari alla base delle malattie e grazie a tali informazioni si stanno progettando e attuando ricerche molto mirate per individuare i farmaci del futuro.

Strategie di ricerca

L'avvio di un programma di ricerca finalizzato alla scoperta di un nuovo farmaco è sempre un avvenimento importante. Si tratta di un primo traguardo, risultato di varie ipotesi di lavoro e di proposte emerse a seguito dell'analisi di diversi fattori: il bisogno terapeutico (*medical need*), le capacità disponibili all'interno del gruppo di ricerca, lo stato dell'arte delle conoscenze, un attento studio dell'evoluzione delle malattie e un'indagine su quanto sta avvenendo in altri laboratori del mondo, incluso l'impegno di gruppi farmaceutici concorrenti (Figura 3.3). Allo stesso modo è una scommessa: sul programma di ricerca selezionato si concentreranno per qualche anno gli sforzi di numerosi ricercatori che con dedizione e professionalità cercheranno di tradurre l'ipotesi iniziale in molecole in grado di modificare il processo patologico nei modelli sperimentali più rappresentativi della malattia. In tutti i programmi di ricerca accade che a momenti di entusiasmo si alternino periodi di frustrazione ma, se si verificano le condizioni giuste, sarà possibile ottenere una molecola da avviare allo sviluppo: un successo già rilevante anche se solo preliminare nel lungo percorso per ottenere un nuovo farmaco (vedi **CD**: Approfondimento 3.3. *Come nasce un progetto su un nuovo farmaco*).

Vari fattori influenzano la scelta delle aree terapeutiche su cui investire. Innanzitutto alcuni farmaci hanno raggiunto un buon livello sia in termini di efficacia che di tollerabilità, disincentivando un ulteriore investimento in ricerca in alcune aree terapeutiche. Gli antiperlipidemici, come le statine, sono un esempio che illustra bene il concetto. Si tratta di farmaci usati da milioni di pazienti, efficaci e ben tollerati. I gruppi farmaceutici impegnati in prima linea nella "lotta al colesterolo" e ai conseguenti disturbi cardiovascolari non hanno interesse a migliorarli ulteriormente: così hanno dirottato le risorse su altri obiettivi. Altro caso è quello dei farmaci antinfiammatori (FANS) per il trattamento sintomatico dell'osteoartrosi. È possibile migliorare il loro profilo, ma, qualora si riuscisse, il costo sarebbe elevato e con limitate probabilità

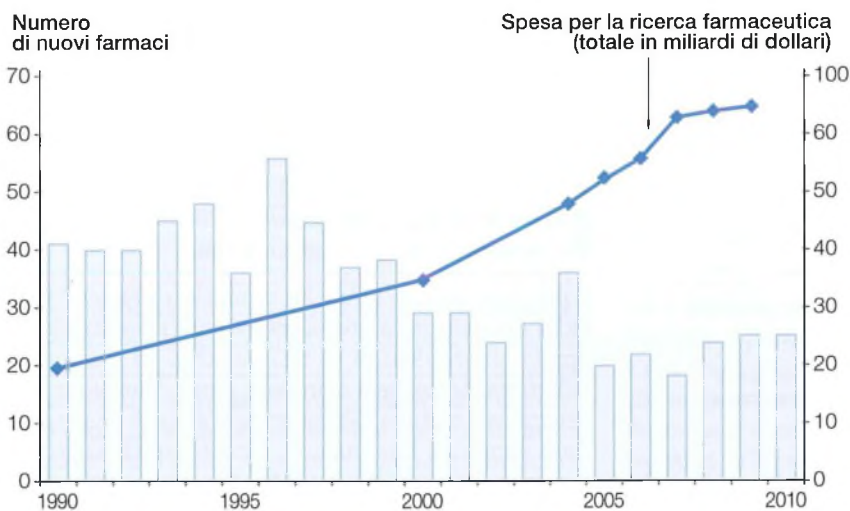


FIGURA 3.2 Investimento in miliardi di dollari nella ricerca e sviluppo di nuovi farmaci. Il grafico fa riferimento alle spese complessive negli Stati Uniti. Notare il notevole aumento delle spese negli ultimi 10 anni. Nello stesso periodo il numero di nuovi farmaci approvati dalla FDA è rimasto stabile.

di successo. A queste considerazioni va aggiunto che il contesto regolatorio è difficile, con politiche sempre più restrittive delle autorità europee e americane (EMA - *European Medicines Agency*, autorità regolatoria europea deputata ad autorizzare la messa in commercio dei nuovi farmaci - e FDA). Per approvare nuovi farmaci, soprattutto per patologie ad ampia diffusione, si richiedono risultati assolutamente privi di ombre, ottenuti con studi impegnativi, molto costosi, su un elevato numero di pazienti trattati per periodi sempre più lunghi. Il risultato finale è che su patologie croniche, per le quali esistono già farmaci, parzialmente efficaci anche se migliorabili, si tende a non investire più.

La crescente diffusione dei farmaci cosiddetti "generici" ha avuto un impatto significativo su questo scenario. La scadenza della protezione brevettuale per numerosi farmaci (fra cui antinfiammatori, antipertensivi, alcune statine, antibiotici e numerosi altri) ha determinato la perdita del "monopolio" da parte dei grandi gruppi farmaceutici, che avevano investito ingenti risorse in ricerca e sviluppo, aprendo il mercato a nuove società che producono e distribuiscono farmaci "copia" (vedi CD: Approfondimento 3.4. *Il brevetto*). Si tratta di un indubbio vantaggio economico immediato per i pazienti che possono accedere al farmaco a un costo ridotto che però ha contraccolpi finanziari pesanti sulla ricerca di ulteriori miglioramenti del profilo farmacologico e di tollerabilità dei farmaci attuali.

I fattori sopra illustrati hanno determinato una situazione di profonda crisi per numerosi gruppi farmaceutici. Gli investimenti in ricerca e sviluppo vengono continuamente rivisti e le società farmaceutiche modificano continuamente il loro assetto, vanno incontro a "fusioni" per raggiungere economia di scala. In questo contesto difficile è emersa tuttavia la tendenza interessante a dirottare la ricerca su patologie più complesse, ma che richiedono un impegno finanziario minore e con risultati teoricamente raggiungibili in tempi più contenuti. Aumentano così gli investimenti delle aziende farmaceutiche su malattie gravi ma a bassa prevalenza, malattie rare (le cosiddette *orphan diseases*), trascurate fino al recente passato (vedi CD: Approfondimento 3.3. *Paragrafo: Numero di pazienti e farmaci orfani*).



FIGURA 3.3 La decisione di investire su un progetto di ricerca dipende da numerosi fattori, scientifici, economici e strategici.

■ Il brevetto come motore di innovazione

Le industrie farmaceutiche e biotecnologiche, una volta individuate le molecole di interesse, investono ingenti risorse per il loro sviluppo solo se hanno la garanzia di essere proprietarie del prodotto finale, il farmaco. Si richiede pertanto alle autorità competenti la copertura brevettuale delle proprie invenzioni. In pratica si deposita all'ufficio brevetti un documento che descrive i dettagli dell'invenzione. Alcuni punti fondamentali per richiedere e ottenere il brevetto sono:

- ▶ la novità (invenzione non conosciuta in precedenza);
- ▶ l'attività inventiva (invenzione non derivabile in modo ovvio dallo stato delle conoscenze);
- ▶ la riproducibilità (dalla lettura del testo è possibile riprodurre il contenuto dell'invenzione);
- ▶ applicabilità industriale.

In generale, i brevetti incoraggiano la ricerca. Infatti, proteggendo e rendendo pubbliche le invenzioni, essi stimolano la competizione, favoriscono gli inventori e rappresentano uno stimolo per sviluppare continuamente soluzioni e prodotti nuovi. Pertanto i brevetti rivestono un ruolo importante nel progresso continuo del settore medico e farmaceutico.

I brevetti hanno una durata limitata: 20 anni dalla data di deposito (con eventuale estensione di alcuni anni). Alla scadenza, il farmaco può essere prodotto da altre società farmaceutiche (farmaci cosiddetti "generici" o "biosimilari") (vedi CD: Approfondimento 3.4).

Le fasi della ricerca

Nel percorso di identificazione (*drug discovery*) di un nuovo farmaco ci sono due fasi ben distinte: la ricerca e lo sviluppo (*Research & Development*, R & D). La ricerca è innovazione sostenuta da una forte competenza scientifica e dal desiderio di raccogliere sfide e battere percorsi inesplorati: l'obiettivo è trovare nuove molecole definendone gradualmente il profilo fino all'identificazione del *lead compound*. Nuove idee nascono da risultati innovativi, di frontiera, che sfruttano le tecnologie più recenti e seguono quindi un percorso poco prevedibile e non scontato. Così, oggi, nei laboratori si fa ricerca con approcci molto diversi rispetto a quanto si faceva solo dieci anni fa (Figura 3.1). Di seguito viene descritto il percorso di ricerca adottato oggi da società farmaceutiche e di biotecnologia. Da questi approcci nasceranno i farmaci del futuro.

■ Avvio di un nuovo progetto e identificazione del lead compound

Il progetto nasce da un'analisi razionale, da ipotesi biologiche sostenute dalla letteratura scientifica internazionale, oppure dai risultati di ricerche interne, ad esempio di bioinformatica su geni e prodotti genici coinvolti in una determinata malattia. Gli spunti per l'avvio di un progetto sono numerosi. Importante è identificare un *target*, un bersaglio biologico ben preciso, come un enzima o un recettore considerati critici nei meccanismi molecolari

della patologia. Questo è un passaggio importante e delicato nella ricerca: sbagliare *target* significa perdere anni di impegno e investimento. L'ipotesi necessita quindi di essere sostenuta da varie prove: il *target* deve essere chiaramente coinvolto nella genesi e nell'evoluzione della patologia e, inoltre, l'intervento su di esso deve modificare in maniera significativa i meccanismi della malattia. Una volta individuato il bersaglio si procede con la preparazione del saggio biologico più appropriato, cellulare o biochimico, per avviare l'HTS. Da qui parte l'analisi automatica di numerosi composti chimici. Ogni gruppo farmaceutico esplora il proprio patrimonio di molecole (da decine di migliaia a milioni), oppure utilizza "chemoteche" di gruppi esterni con cui si stringono accordi di collaborazione. Si aumenta così la probabilità di trovare composti attivi, i cosiddetti *hit*. Questi sono il punto di partenza, le strutture di base per un successivo sforzo dei chimici farmaceutici e dei biologi il cui compito è identificare il prototipo, il *lead compound*. Grazie a strumenti e tecnologie sempre più avanzate, quali la modellistica molecolare, si riesce in tempi brevi a identificare molecole che possiedono un profilo farmacologico di interesse, confrontarle con altre strutture simili che si possono reperire dalla documentazione scientifica o dal proprio archivio, ed elaborare sintesi di nuove molecole, con l'obiettivo di migliorarne le caratteristiche.

Un'attenzione elevata viene dedicata, come in passato, ai prodotti di origine naturale, soprattutto quelli derivanti dal regno vegetale. Questi sono la fonte più antica di farmaci e sono tuttora di notevole interesse. Ad esempio ci sono progetti per valutare campioni prelevati in foreste caratterizzate da elevata biodiversità come le foreste pluviali. Anche i brodi di fermentazione di batteri sono esaminati per la loro attività biologica con i processi automatizzati dell'HTS. Lo stesso processo si può seguire per valutare altre fonti naturali, promettenti per la loro ricchezza ed eterogeneità di strutture chimiche, quali i prodotti provenienti dalla biologia marina come le alghe, i microrganismi e gli animali invertebrati. Collezioni di materiale prelevati dagli oceani, a vari livelli di profondità in zone tropicali, sono una fonte molto ricca di nuovi composti chimici, diversi da quelli provenienti da fonti terrestri. I prodotti, una volta prelevati e tenuti in condizioni appropriate, sono valutati per l'attività biologica. Con queste ricerche sono stati identificati composti innovativi, oggi in fase di sviluppo, aventi attività antitumorale o antinfiammatoria. Questi programmi di *screening* sono molto impegnativi in termini di tempo ed energia e l'isolamento dei principi attivi, nonostante le tecnologie avanzate, rimane un processo laborioso. Tuttavia, le fonti naturali consentono di scoprire composti dotati di strutture chimiche originali e uniche, difficilmente progettabili altrimenti. L'elemento chiave dei programmi di *screening* di sostanze naturali è la scelta dei campioni da analizzare e l'utilizzo di tecnologie altamente automatizzate. Più alto è il numero dei campioni e maggiore è la probabilità di successo. Il traguardo fondamentale, quindi, obiettivo comune dei ricercatori protagonisti di un progetto di ricerca, è l'identificazione di un *lead compound*, il composto guida. Solo con l'otte-

nimento di un valido *lead* il programma di ricerca potrà decollare (Figura 3.4).

La chimica farmaceutica: dall'approccio tradizionale alla modellistica molecolare

Il chimico farmaceutico ha sempre avuto un ruolo chiave nella progettazione di nuovi farmaci. Numerosi farmaci oggi disponibili sono stati ottenuti con la "sintesi razionale", cioè partendo dalle conoscenze del *target* biologico che si era identificato. Questo è particolarmente vero per i farmaci progettati partendo dalla struttura del mediatore naturale per un recettore o per un enzima. Vari agonisti e antagonisti dei recettori per i sistemi delle catecolamine, dell'istamina, dell'acetilcolina, oppure inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina II o dell'acetilcolinesterasi, per fare qualche esempio, sono stati ottenuti in questo modo. In genere si mantiene l'azione agonista con molecole di dimensione simile al ligando endogeno, mentre con gruppi chimici più ingombranti si può passare da un composto agonista a uno antagonista. Un esempio interessante è costituito dal percorso seguito da James Black (premio Nobel per la Medicina e Fisiologia nel 1988) nella scoperta di antagonisti del recettore β -adrenergico prima, e del recettore H_2 dell'istamina successivamente. Un percorso che ha portato all'identificazione di due farmaci innovativi, entrambi capostipiti di una nuova classe, il propranololo e la cimetidina (vedi Bibliografia).

Questo approccio tradizionale è stato successivamente integrato con la modellistica molecolare, grazie alla disponibilità di computer e programmi sempre più sofisticati (ad esempio, *Computer-Aided Drug Design*, CADD). Le informazioni disponibili sulla geometria delle molecole, le possibili conformazioni e le proprietà chimico-fisiche (energia, orbitali molecolari, densità elettronica ecc.) rendono possibile fare previsioni circa l'interazione fra il farmaco e il sito di legame. Ci sono programmi di modellistica molecolare che consentono di determinare le caratteristiche tridimensionali di una serie di molecole attive. Attraverso varie analisi si arriva a ipotizzare la conformazione biologicamente attiva, cioè quella che interagisce con il recettore o con il sito attivo dell'enzima. Si stabilisce la relazione fra le proprietà chimico-fisiche della molecola (ad esempio, *Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR) oppure i campi molecolari (*Comparative Molecular Field Analysis*, CoMFA) e l'attività farmacologica. Un grande cambiamento è avvenuto a partire da metà degli anni 80 con lo sviluppo della chimica combinatoriale, un approccio rivoluzionario, che ha avuto una rapida diffusione. L'obiettivo è aumentare il numero di molecole di cui valutare l'attività biologica, e quindi avere maggiori probabilità di scoprire molecole attive. È diventato così possibile produrre anche milioni di molecole strutturalmente correlate. Il principio di base della chimica combinatoriale è costruire collezioni di numerosi prodotti contenenti un alto numero di varianti della struttura fondamentale. L'idea di fondo è partita dallo studio dei peptidi: è possibile costruire "n" combinazioni di peptidi (parecchi milioni) utilizzando i venti amminoacidi naturali e modificando le loro associazioni. Con sistemi altamente automatizzati

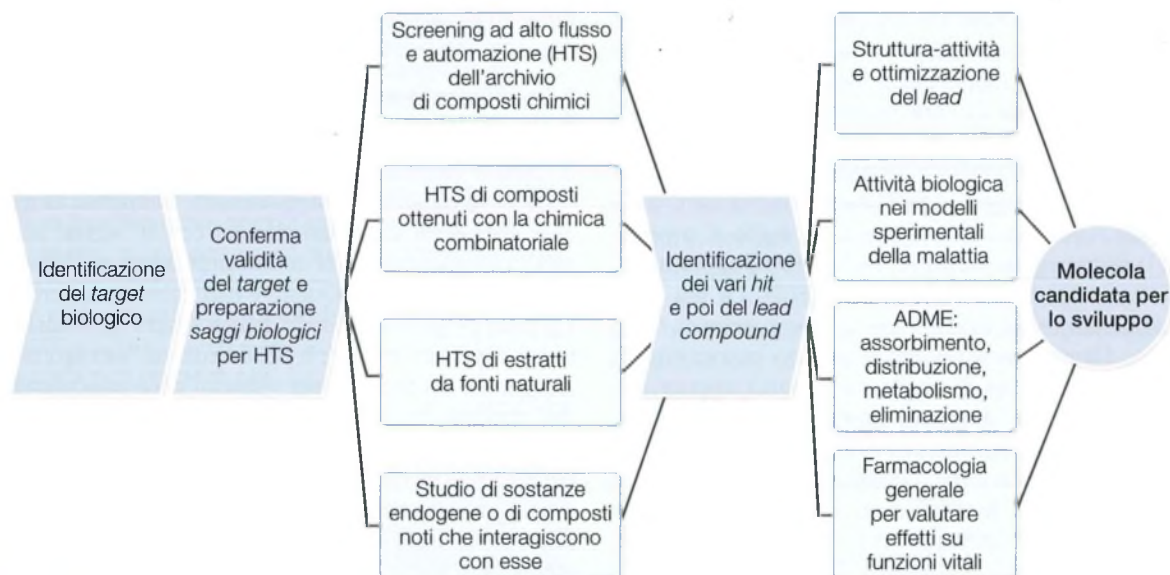


FIGURA 3.4 Passaggi critici nel percorso di ricerca di nuovi farmaci. Il percorso è valido soprattutto per la ricerca di molecole a basso peso molecolare con un contributo fondamentale della chimica di sintesi. La scoperta di "proteine terapeutiche", i vaccini, la terapia genica e gli oligonucleotidi antisense seguono un percorso differente.

è così possibile produrre migliaia di nuove combinazioni al giorno. Lo stesso approccio è stato poi applicato per la sintesi di composti organici a basso peso molecolare, i più interessanti per la chimica farmaceutica. Le collezioni di composti vengono poi studiate con metodi di *screening* rapido per far emergere eventuali combinazioni dotate di attività biologica. Solo in presenza di attività farmacologica si procederà alla separazione di molecole attive e alla identificazione della loro struttura (Figure 3.1 e 3.4).

La progettazione dei farmaci può partire anche dalle conoscenze del sito di legame, quindi delle macromolecole, ad esempio proteine. È questo un settore in rapida evoluzione in quanto si muove in parallelo con la crescita delle conoscenze in biologia molecolare e l'identificazione continua di proteine e delle loro funzioni. Inoltre, sono disponibili potenti strumenti di analisi per la risoluzione di strutture complesse (ad esempio, cristallografia a raggi X, spettrometria a risonanza magnetica nucleare). In questo modo sono state risolte le strutture di enzimi importanti (ad esempio, proteasi dell'HIV, siti attivi di isoforme del citocromo P450) con le conseguenti ricadute sulla progettazione dei farmaci. In pochi anni il numero di proteine, la cui struttura è depositata presso banche dati, è cresciuto rapidamente, dalle poche centinaia negli anni 90 a oltre 60.000 nel 2010. Un importante approccio per selezionare in maniera più mirata i nuovi composti è basato sullo "screening virtuale"; in altri termini si usano modelli computazionali per individuare le strutture chimiche più appropriate (una ricerca tramite computer, per questo denominata *in silico*). Così, nella scelta dei composti da esaminare si considerano il *target* biologico con le sue principali caratteristiche chimico-fisiche, si eliminano molecole con gruppi funzionali potenzialmente tossici, si presta attenzione alle proprietà di base ritenute critiche per ottenere un farmaco efficace (solubilità, peso

molecolare, lipofilia, possibilità di assorbimento e biodisponibilità ecc). Inoltre, con potenti modelli informatici si fa un confronto con strutture chimiche già note per la loro attività farmacologica, si valutano le probabilità di interazioni con isoforme del citocromo P450, la possibilità di indurre effetti collaterali, ad esempio, mutagenesi. Il risultato finale è la selezione di un numero elevato di composti che offrono la più alta probabilità di ottenere *hit* e successivamente *lead compound* efficaci, molecole candidate per essere avviate allo sviluppo.

■ Farmaci biologici

I farmaci ottenuti con la sintesi chimica hanno avuto, e hanno tuttora, un ruolo primario in terapia. Tuttavia, alla fine degli anni 70 con l'emergere delle nuove conoscenze in biologia molecolare, con la disponibilità della tecnologia del DNA ricombinante e la scoperta degli anticorpi monoclonali si sono poste le basi per la progettazione di farmaci cosiddetti biotecnologici. Il risultato è che dopo circa 30 anni sono disponibili oltre 200 farmaci altamente innovativi e numerosi altri sono in fase di sviluppo o in attesa di approvazione. Basti pensare all'insulina, agli interferoni α e β , all'interleuchina-2, all'eritropoietina, agli stimolatori della crescita di colonie cellulari (G-CSF e GM-CSF), all'attivatore del plasminogeno tissutale (alteplase o tPA), agli inibitori della glicoproteina IIb/IIIa piastrinica e ai numerosi anticorpi monoclonali (Tabella 3.1). Così, se nel 2000 i farmaci di provenienza biotecnologica rappresentavano meno del 10% dei farmaci disponibili, dieci anni dopo hanno conquistato un notevole spazio, con una tendenza in continua crescita, soprattutto nel campo dei tumori e delle malattie a base immunologica. È da rilevare l'aumento del numero di anticorpi umani, un progresso scientifico significativo rispetto agli anticorpi monoclonali

di origine murina o umanizzati sviluppati nel primo periodo (vedi CD: Approfondimento 3.5. *I farmaci biotech*).

I farmaci biotecnologici hanno tuttavia il grosso limite di non essere somministrabili per via orale. La necessità di trattamenti per via parenterale ne preclude la maneggevolezza oltre che aumentarne i costi, riducendo pesantemente lo sviluppo di tali farmaci in patologie ad ampia diffusione.

Un ulteriore cambiamento è in corso con l'introduzione dei cosiddetti "biosimilari", farmaci biologici in versione "generica" delle molecole originali. A differenza dei farmaci di origine sintetica, in questo caso ci sono parecchie complicazioni da superare. Ad esempio, è necessario che la proteina "copia" (biosimilare appunto) mantenga le proprietà terapeutiche e la sicurezza (ad esempio, mancanza di immunogenicità) del farmaco di origine. Su questo argomento le linee guida delle varie legislazioni sono in rapida evoluzione (vedi CD: Approfondimento 3.6. *I test di tossicologia*).

Come si seleziona un farmaco

Il ruolo dei saggi in vitro e dei modelli sperimentali

Indipendentemente dalla provenienza, sia essa una collezione di composti chimici o una serie di prodotti naturali, un passaggio fondamentale è quello della selezione (*screening*) di molecole o di prodotti che possiedono proprietà farmacologiche di interesse, cioè in grado di agire con sufficiente potenza e secondo i modi stabiliti (ad esempio, agonista o antagonista, inibitore ecc.) sul *target* che si è definito. In questa fase critica è importante la disponibilità di un saggio biologico rapido, sensibile, riproducibile e rilevante per la patologia che si sta studiando. Per comprendere meglio il processo si può seguire uno dei percorsi più collaudati, quello della ricerca di molecole attive sui recettori di membrana accoppiati alle proteine G (vedi Capitolo 13). Innanzitutto si preparano linee cellulari che, tramite transfezione del DNA appropriato, esprimono il recettore. La scelta è sempre per il recettore umano: ci sono state esperienze negative in passato con farmaci studiati su recettori animali e poi scoperti essere poco attivi nell'uomo a causa di differenze recettoriali esistenti fra specie diverse. Inoltre è importante avere a disposizione un *marker*, ad esempio, un ligando radioattivo che si lega con elevata affinità al recettore. In mancanza del ligando si possono utilizzare *marker* che rilevino modificazione di attività funzionali a livello intracellulare sui segnali attivati a seguito del legame fra la molecola e il recettore (ad esempio, formazione di AMP ciclico, attivazione di CREB, variazioni della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare). Una volta preparato il saggio biologico, in questo caso la linea cellulare con il recettore umano, e adattato al sistema robotizzato dell'HTS, si inizia il processo di *screening* di migliaia di molecole. Un simile procedimento viene usato anche per *target* biologici differenti, quali recettori intracellulari, recettori legati a canali ionici, enzimi. Cambia il segnale che viene rilevato; può essere un segnale intracellulare, l'attivazione di un gene *reporter* quale la luciferasi, oppure modifiche del potenziale di membrana. I composti dotati di potenza accettabile sono poi esami-

TABELLA 3.1 Esempi di farmaci biotecnologici disponibili in terapia

Prodotto	Applicazione	Anno
Proteine terapeutiche		
Insulina	Diabete tipo I	1982
Somatotropina	Deficit crescita	1984
Interferone α e β	Antivirale, epatite C, sclerosi multipla	1986-1996
Alteplase (tPA)	Trombosi	1987
Eritropoietina	Eritropoiesi	1988
Filgrastim (G-CSF)	Leucopenia	1991
Fattore VIII e IX	Emofilia	1993-1997
Retepase	Trombosi	1995
Follitropin α e β	Infertilità femminile	1996
Etanercept	Artrite reumatoide	1998
Anakinra	Artrite reumatoide	2002
Glucosidase	Malattia di Pompe	2006
Trombina	Sanguinamento	2007
Liraglutide (GLP-1)	Diabete tipo 2	2010
Anticorpi monoclonali terapeutici		
Muromonab (OKT3)	Trapianto Organi	1986
Abciximab	Trombosi	1995
Declizumab	Trapianto organi	1997
Infliximab	Morbo di Chron, artrite reumatoide	1998-2000
Basiliximab	Trapianto organi	1998
Palivizumab	Malattie infettive	1998
Rituximab	Linfoma non-Hodgkin	1997
Trastuzumab	Cancro del seno	1998
Gemtuzumab	Leucemia mieloide acuta	2000
Alemtuzumab	Leucemia linfocitaria cronica	2001
Adalimumab	Artrite reumatoide	2002
Bevacizumab	Cancro del retto	2004
Natalizumab	Sclerosi multipla e morbo di Chron	2006
Panitumumab	Cancro del retto	2006
Ranibizumab	Degenerazione maculare	2006
Golimumab	Cancro del retto	2009
Ustekinumab	Psoriasi	2009
Denosumab	Osteoporosi	2010

nati per la loro selettività, per escludere l'interazione con una serie di altri recettori o enzimi. L'obiettivo finale è la possibilità di ottenere un composto potente e altamente selettivo che agisca sul *target* biologico desiderato senza interferire con altri sistemi. Con queste informazioni disponibili continua l'interazione fra ricercatori, chimici e biologi, per l'individuazione di molecole potenti e selettive. A questo punto è necessario disporre di modelli sperimentali validi, cioè modelli che riproducano in vitro e in vivo le caratteristiche della malattia su cui si vuole intervenire. Ad esempio, nella ricerca di farmaci antitumorali si potrà valutare l'attività delle molecole su linee tumorali in vitro, studiarne gli effetti sul ciclo cellulare, sulla regressione della massa tumorale e sulla soprav-

vivenza in vivo. Ogni modello sperimentale combina i disturbi caratteristici della malattia (ad esempio, deficit cognitivo o presenza di placche di β -amiloide nei modelli di *Alzheimer*; disturbi motori nei modelli di *Parkinson*) con i difetti morfologici e biochimici tipici della malattia (ad esempio, lesioni delle vie dopaminergiche nei modelli di *Parkinson*). Grandi progressi sono stati ottenuti con l'uso di animali transgenici. È così possibile oggi usare topi che, ad esempio, producono β -amiloide a livello cerebrale con formazione di placche simili a quelle presenti in pazienti affetti da *malattia di Alzheimer*. Allo stesso modo, molecole mirate al trattamento dell'obesità si possono valutare anche in topi portatori di vari difetti genetici che inducono una patologia simile a quella umana. Notevole è il contributo che gli animali transgenici hanno fornito sia per acquisire conoscenze sulla funzione di geni specifici e relativi prodotti che in qualità di modelli sperimentali utili per la ricerca di farmaci.

Numerose molecole che mostrano azioni farmacologiche interessanti possono indurre effetti avversi su organi e sistemi differenti da quelli previsti per l'attività terapeutica. Ad esempio, su nuove molecole selezionate per l'attività in modelli di asma, di infezioni fungine, di sclerosi multipla ecc. diventa necessario studiare gli eventuali effetti collaterali sui sistemi cardiovascolare e nervoso centrale, le azioni a livello gastroenterico, gli effetti sull'escrezione renale. In questo modo si potrà valutare se la molecola selezionata possiede le caratteristiche farmacologiche per poter proseguire con le fasi dello sviluppo: attività sulla patologia bersaglio senza effetti avversi significativi (vedi CD: Approfondimento 3.7. *Safety pharmacology: come valutare se le nuove molecole inducono effetti collaterali sulle funzioni vitali*).

■ Gli studi sul genoma stanno modificando la ricerca

Dal 1992 in poi il Progetto Genoma e il rapido sviluppo della bioinformatica hanno catalizzato una grossa spinta innovativa che ha portato ingenti investimenti nel settore *genomics*, la genomica medica. Con la prospettiva del completo sequenziamento del genoma umano, si era creata l'enorme aspettativa di scoprire rapidamente i geni responsabili di numerose malattie e quindi ottenere farmaci innovativi perché maggiormente selettivi sulle cause della malattia. Finora invece i risultati sperati sono stati parzialmente disattesi per una serie di motivazioni. Innanzitutto i tempi per individuare il ruolo dei singoli geni e delle proteine in condizioni sia fisiologiche che patologiche sono lunghi, superiori a quanto ipotizzato. A questo si aggiunge che per identificare una proteina con potenziale uso in terapia o composti a basso peso molecolare capaci di interagire con i nuovi *target* suggeriti dalla genomica sono necessari anni di intensa ricerca. Si può tuttavia ipotizzare che in futuro emergeranno certamente farmaci innovativi provenienti da queste conoscenze.

Ci sono alcune considerazioni convincenti alla base della rivoluzione iniziata con il progetto genoma su cui numerosi gruppi di ricerca farmaceutica e biotecnologica hanno scommesso. Innanzitutto la conoscenza dei geni e delle proteine si traduce in numerosi *target* biologici. Se

si considera che tutti i farmaci oggi disponibili in terapia agiscono su meno di 500 *target* biologici, è evidente che dallo studio del genoma umano ci si aspetta la scoperta di nuovi importanti bersagli su cui indirizzare le ricerche di farmaci più selettivi. Molte malattie sono causate da difetti genetici. Sia le malattie ereditarie, di cui già si conoscono in parecchi casi il gene o i geni implicati, che quelle ad ampia diffusione, ad esempio tumori, aterosclerosi, *malattia di Alzheimer*, osteoporosi, sono caratterizzate da alterazioni specifiche di alcuni geni e dell'attività genica. È quindi necessario conoscere quali geni siano espressi nei tessuti sani e quali siano invece alterati in condizioni patologiche: queste conoscenze, una volta disponibili, potrebbero consentire di progettare farmaci mirati alle cause (e non solo ai sintomi).

Inoltre è possibile studiare le differenze genetiche dei pazienti per comprendere le diverse sensibilità ai farmaci. Le implicazioni sono ampie: sarà possibile l'utilizzo mirato di farmaci su quei pazienti che, sulla base del genotipo, si prospettano essere più sensibili a un certo trattamento farmacologico. Si potrà altresì evitare il trattamento di pazienti eventualmente resistenti all'attività del farmaco oppure suscettibili di manifestare effetti collaterali significativi. La possibilità di stabilire una correlazione fra genotipo e risposta farmacologica dei pazienti è resa possibile dalla disponibilità di tecnologie che consentono di stratificare i pazienti sulla base del profilo genico, cioè costruire delle *DNA library* individuali. Alcuni gruppi farmaceutici stanno investendo notevoli risorse nella ricerca di diagnostici che consentano di selezionare i pazienti più appropriati per una certa terapia, ottenendo la massima efficacia ed effetti collaterali estremamente ridotti (i cosiddetti "theranostics"). Una sorta di farmacologia *à la carte*: una vera rivoluzione dal punto di vista terapeutico.

■ Gli studi di farmacocinetica

hanno un ruolo sempre più rilevante

Una pillola al giorno: questa è la caratteristica che un buon farmaco dovrebbe possedere, efficace quando somministrato per via orale e con durata d'azione tale da consentire una sola somministrazione al giorno. Succede di frequente, in ricerca, che molecole molto interessanti per l'attività biologica in vari modelli sperimentali in vitro abbiano una bassa biodisponibilità orale, cioè la quota di farmaco che raggiunge il circolo ematico è troppo bassa, oppure non siano per nulla attive in vivo (vedi Capitoli 50-53).

Fino a pochi anni fa, gli studi di farmacocinetica (ADME: assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione) venivano condotti in una fase avanzata dello sviluppo di un farmaco, insieme agli studi di tossicologia. L'esperienza ha però dimostrato che più di un terzo delle molecole in fase di sviluppo dovevano essere abbandonate per problemi di ADME (ad esempio, assorbimento insufficiente, metabolismo epatico troppo rapido, metaboliti tossici, induzione enzimatica, emivita di eliminazione troppo breve o troppo lunga ecc.). Si è arrivati quindi ad anticipare alcuni saggi di farmacocinetica nelle prime fasi della ricerca. Secondo i criteri più moderni, già nelle fasi di identificazione delle molecole attive, *hit* e poi

lead, si valuta il profilo ADME sia *in silico*, cioè tramite simulazione con il computer, che *in vitro* (Figura 3.4). Con gli approcci computazionali si mettono in relazione le caratteristiche chimico-fisiche con specifiche proprietà ADME desiderate o da evitare. Vengono poi effettuati saggi *in vitro* per valutare l'assorbimento intestinale (ad esempio, cellule caco-2), la stabilità metabolica in microsomi epatici umani e di roditore o nella frazione microsomiale S9, le interazioni con gli isoenzimi del citocromo P450 e il *binding* alle proteine plasmatiche (vedi Capitolo 48). Con questo processo si attua uno *screening* più stringente, raccogliendo informazioni preziose nelle fasi precoci. Successivamente si procede a valutare *in vivo* il profilo delle molecole selezionate. I metodi analitici disponibili oggi, ad esempio la spettrometria di massa associata a cromatografia liquida ad alta pressione oppure la risonanza magnetica nucleare ad alta risoluzione, consentono analisi rapide dei livelli plasmatici e della concentrazione in organi bersaglio delle molecole somministrate a piccoli animali da laboratorio. È noto che diverse specie animali differiscono per il corredo di enzimi microsomiali epatici e di conseguenza possono trasformare in maniera differente i farmaci. Diventa quindi importante individuare qual è la specie animale più adatta per gli studi di tossicologia così da ottenere informazioni accurate e attendibili sulla sicurezza del farmaco destinato all'uomo. Studi di farmacocinetica più approfonditi vengono poi ripresi durante lo sviluppo del farmaco, in parallelo agli studi di tossicologia, sia per conoscerne meglio il profilo sia per soddisfare le richieste delle agenzie regolatorie (Figura 3.5).

Le fasi dello sviluppo

Identificata una molecola di interesse, avente il potenziale di diventare un farmaco innovativo, si procede con lo sviluppo, la parte sicuramente più lunga e costosa del processo che porta alla disponibilità di nuovi medicinali (Figura 3.6). Questa fase è condizionata da due fattori critici: tempi e costi. Ci si può trovare nella condizione di dover fare delle scelte, procedendo con lo sviluppo di una molecola o di un progetto a scapito di altri, magari altrettanto innovativi e interessanti. Infatti, dalle fasi della ricerca possono emergere più molecole di quante se ne possano sviluppare sia in termini di finanziamenti che di risorse disponibili. Quindi prima di proseguire con lo sviluppo si procede a un'attenta revisione del progetto. I passaggi chiave dello sviluppo di un farmaco includono: la produzione del candidato farmaco in grande quantità e con elevato grado di purezza, la formulazione del prodotto, studi di farmacocinetica e tossicologia e infine la preparazione della documentazione da sottoporre alle autorità regolatorie per iniziare gli studi clinici sull'uomo. Si parla quindi di sviluppo pre-clinico per distinzione dalla fase successiva nota appunto come sviluppo clinico.

Il ruolo determinante della legislazione nazionale e sovranazionale

Elemento condizionante di tutta la fase di sviluppo è la

legislazione farmaceutica, che impone regole ben precise per garantire l'efficacia e la sicurezza dei nuovi farmaci. Essa regola due momenti critici dell'interazione tra società farmaceutiche e autorità regolatorie di riferimento per un dato paese (FDA negli Stati Uniti, EMA in Europa): il primo è l'autorizzazione a iniziare la sperimentazione sull'uomo sia che si tratti di volontario sano che di paziente; il secondo passaggio critico è la richiesta formale di approvazione per l'utilizzo e la commercializzazione del farmaco (vedi Capitolo 4).

Durante le fasi dello sviluppo la legislazione farmaceutica impone requisiti stringenti di qualità e garanzia sull'integrità, rintracciabilità e ripetibilità dei dati e dei prodotti. Gli strumenti che consentono di perseguire questi obiettivi sono un insieme di linee guida, introdotte prima negli Stati Uniti e poi successivamente recepite dagli altri paesi. In maniera più specifica vanno osservate le seguenti norme:

- ▶ *Good Laboratory Practices* (GLP), definiscono i principi da seguire durante gli studi di tossicologia e di farmacocinetica;
- ▶ *Good Clinical Practices* (GCP), norme per assicurare la qualità e la riproducibilità dei dati durante la sperimentazione sull'uomo;
- ▶ *Good Manufacturing Practices* (GMP), linee guida per la produzione e il controllo dei medicinali così da garantirne la qualità per tutto il periodo di validità.

Il passaggio da una preparazione di laboratorio a una industriale

Durante le prime fasi della ricerca, la preparazione delle molecole in esame avviene nei laboratori chimici o di biotecnologia: servono infatti solo piccole quantità di sostanza (ad esempio, milligrammi, fino a pochi grammi). Con l'inizio degli studi di tossicologia e, successivamente, con la sperimentazione clinica la richiesta di prodotto diventa elevata: per farmaci di origine chimica servono chilogrammi di principio attivo. Sia la sintesi chimica che la produzione per via biotecnologica vanno adattati e migliorati perché soddisfino vari criteri: rapidità, economicità, sicurezza (processo di *scale-up*). Per la sintesi chimica si cercherà di ottenere un metodo di purificazione efficiente e poco costoso, di eliminare l'uso di solventi o reazioni troppo pericolose, di evitare reazioni che portano a prodotti tossici. Altra recente tendenza è quella di preferire vie sintetiche che non introducano elementi inquinanti nell'ambiente (*green chemistry*). Nel caso di proteine ottenute da microrganismi geneticamente modificati o da linee cellulari sarà importante ottenere processi stabili, che garantiscano le caratteristiche finali del prodotto (ad esempio, struttura tridimensionale della proteina, assenza di contaminazione da endotossine o virus). La legislazione prevede inoltre il controllo rigoroso delle impurezze che devono rimanere al di sotto di una soglia prefissata e non devono avere rischio mutageno. Attraverso uno sforzo continuo e competenze specifiche si ottimizza il processo di produzione su ampia scala per ottenere una quantità sufficiente

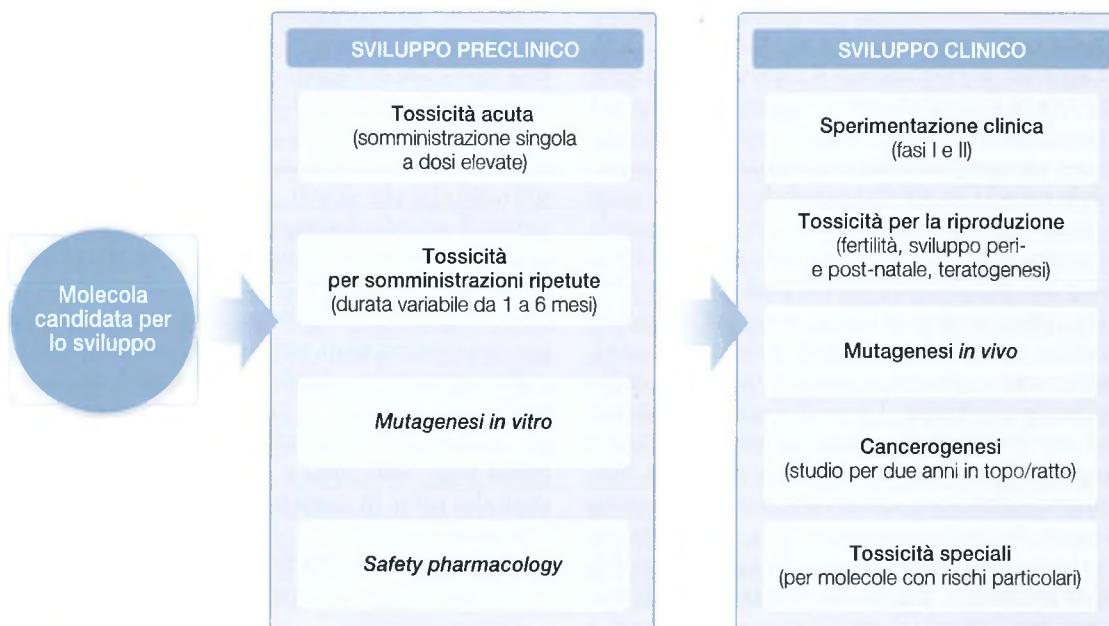


FIGURA 3.5 Percorso degli studi tossicologici per verificare la sicurezza dei nuovi farmaci. Da notare che la molecola candidata per lo sviluppo viene esaminata nei test di tossicità acuta, di tossicità per somministrazioni ripetute e nelle prove di mutagenesi *in vitro*. Se non si riscontrano effetti rilevanti, si può allora procedere con le fasi I e II dello sviluppo clinico. In parallelo si prosegue con il programma di tossicologia più completo.

di prodotto di elevata qualità, per completare tutte le fasi dello sviluppo e successivamente rendere disponibile il farmaco per i pazienti.

Come passare dal prodotto attivo al farmaco: la forma farmaceutica

La via di somministrazione e la forma farmaceutica sono caratteristiche fondamentali per un farmaco. L'utilizzo in maniera corretta avviene solo se il farmaco è facile da assumere; questo vale soprattutto per patologie croniche per le quali l'assunzione per via orale è preferita insieme alla riduzione del numero di somministrazioni giornaliere (ad esempio, una volta al giorno). Per malattie acute o trattamenti in ambiente ospedaliero sono accettabili, e talvolta necessarie, altre vie di somministrazione, come la via parenterale (ad esempio, via endovenosa), che consentono il rapido raggiungimento delle concentrazioni plasmatiche terapeutiche.

Ci sono tuttavia numerosi ostacoli da superare per raggiungere l'obiettivo di una forma farmaceutica semplice e che garantisca la massima accettazione (*compliance*) da parte dei pazienti. I più rilevanti dipendono dalle proprietà chimico-fisiche dei principi attivi. Ci sono molecole che sono poco biodisponibili per via orale e che tuttavia si sviluppano perché hanno un'efficacia terapeutica significativa. Ne sono un esempio farmaci biologici quali peptidi e proteine che vengono somministrati solo per via parenterale. Questo è un grosso limite per i farmaci biologici. Numerosi studi sono in corso per ottenere l'assorbimento, anche parziale, per via orale (ad esempio, con l'insulina) tuttavia finora senza successo. Vie di somministrazioni rilevanti sono anche

la via inalatoria e le vie transmucosali, cioè attraverso la cavità boccale, nasale, oculare e rettale. Il trattamento per via transdermica (cerotti) è altresì di notevole interesse. Notevoli progressi sono stati fatti e sono tuttora in corso per rilasciare il farmaco nel tessuto, direttamente nei compartimenti coinvolti dalla patologia. A questo scopo la rapida evoluzione delle nanotecnologie sta aprendo nuove prospettive soprattutto per la cura dei tumori nei quali i nanovettori potrebbero veicolare in modo mirato il farmaco al tessuto malato (vedi CD: Approfondimento 3.8. *Drug delivery*).

In alcune malattie oftalmiche, quali la retinopatia diabetica o la degenerazione maculare, il farmaco (ad esempio, anticorpo anti-VEGF o glucocorticoide) viene somministrato tramite iniezione nell'umor vitreo. È possibile inoltre modulare la durata dell'azione di un farmaco, ad esempio utilizzando polimeri, che consentono il rilascio del farmaco per un periodo di tempo prolungato.

Come studiare la sicurezza di un farmaco: gli studi tossicologici

Negli ultimi 50 anni sono aumentate le prove biologiche per ridurre il rischio che le nuove molecole, una volta farmaci, abbiano effetti tossici sull'uomo. È questo un obiettivo ambizioso data la natura stessa del farmaco, un composto che modifica, spesso in maniera profonda, i meccanismi biologici e che inevitabilmente può produrre anche effetti tossici.

I test da eseguire sono definiti dalle normative vigenti, modificate negli anni in maniera differente nei vari Paesi. Solo di recente è iniziato un processo di armonizzazione delle richieste imposte dai vari Paesi e si sta arrivando ad

avere prove tossicologiche uniformi a livello internazionale (vedi CD: Approfondimento 3.6. e 3.7). L'obiettivo è valutare gli eventuali effetti tossici di una nuova molecola su organi e sistemi, utilizzando sia prove biologiche in vitro che test su animali da laboratorio. Gli studi tossicologici dovrebbero fornire le seguenti risposte:

- ▶ definire la dose massima che non induce alcun effetto, diretto o indiretto, su organi e sistemi;
- ▶ definire la dose che induce effetti tossici e il tipo di alterazioni indotte;
- ▶ definire la relazione fra dose terapeutica e dose tossica;
- ▶ individuare il bersaglio dell'effetto tossico (struttura cellulare, organo o sistema) sia del composto originale che dei suoi metaboliti;
- ▶ definire se gli effetti sono reversibili.

Numerosi studi dimostrano che la maggioranza degli effetti tossici di composti chimici nell'uomo si possono replicare nell'animale da laboratorio: da qui la validità dei test di tossicologia previsti dagli enti regolatori internazionali. Si utilizzano dosi elevate, a valori multipli della dose terapeutica, per evidenziare effetti che potrebbero comparire con bassa frequenza in una popolazione ampia di pazienti. L'uso degli animali ha sempre provocato forti critiche; tuttavia a oggi non esistono altri modelli alternativi accettati dalle linee guida ufficiali anche se sono emersi risultati incoraggianti da numerosi studi di tossicità su linee cellulari. Nonostante gli sforzi compiuti finora, solo i test di mutagenesi in vitro sono entrati a far parte della serie di prove obbligatorie per la sperimentazione tossicologica. Da alcuni anni si sta facendo una revisione critica di tutti i protocolli di tossicologia sperimentale per arrivare a un ulteriore miglioramento della serie di test a cui sottoporre le nuove molecole, in termini sia di valore predittivo che di condizioni sperimentali (ad esempio, riduzione del numero di animali).

Nonostante l'accuratezza dei dati raccolti nei vari modelli di laboratorio, sia in termini di efficacia che di sicurezza, è necessario studiare i nuovi potenziali farmaci anche nell'uomo, attraverso un percorso regolamentato di sperimentazione clinica (Figura 3.6). L'indagine sull'uomo è prevista dalla legislazione internazionale e va impostata secondo criteri rigorosi.

I farmaci del 2020

Il 2020: un orizzonte temporale lontano dalla nostra realtà. Eppure, nel mondo della ricerca, i farmaci di quel periodo si stanno già progettando nei laboratori. Oggi sono all'inizio del lungo percorso, in fase embrionale, ancora da perfezionare e migliorare. Ma la "navigazione" è già iniziata: attraverso mille ostacoli, numerosi possibili fallimenti, nuove molecole arriveranno sicuramente in porto. Come già avvenuto negli ultimi 60 anni assisteremo a contributi significativi in terapia. L'attenzione crescente sulle malattie rare è una novità importante e pone le premesse affinché si conseguano risultati di rilievo in aree terapeutiche finora trascurate (malattie e farmaci orfani).

Alcune caratteristiche dei nuovi farmaci si possono già immaginare: saranno efficaci, più maneggevoli e più sicuri. Efficaci perché oggi solamente farmaci che dimostrano attività farmacologica chiara e che migliorano la terapia già disponibile hanno possibilità di proseguire il loro sviluppo. Inoltre, la ricerca è sempre più focalizzata su malattie per le quali la terapia attuale è ancora insoddisfacente se non carente del tutto. Maneggevoli perché si stanno facendo notevoli progressi nel modo di somministrare i farmaci. Le somministrazioni per via orale, inalatoria, transdermica o attraverso le mucose, saranno dominanti e consentiranno l'uso più facile garantendo una maggiore *compliance* da parte dei pazienti. Sicuri, perché i modelli sperimentali oggi disponibili e l'attenzione che si pone agli effetti collaterali durante il lungo percorso di ricerca e sviluppo consentono solo a farmaci, con un elevato indice terapeutico e con rischio bassissimo di produrre reazioni avverse, di arrivare al traguardo finale.

Accanto ai farmaci provenienti dalla sintesi chimica è prevedibile continui la crescita dei farmaci biologici, delle proteine terapeutiche inclusi gli anticorpi monoclonali umani.

Un'altra innovazione emergente proviene dalla possibilità di selezionare la popolazione di pazienti sia sulla base delle loro capacità metaboliche che sulla base dell'alterazione genetica sottostante la malattia. La farmacogenetica sta progredendo velocemente e si può quindi prevedere l'utilizzo combinato di test diagnostico-farmaco per in-



(*): Autorizzazioni richieste all'ente regolatorio negli USA, *Food and Drug Administration* (FDA)

(°): Autorizzazioni richieste all'ente regolatorio europeo, *European Medicinal Agency* (EMA)

FIGURA 3.6 Percorso complessivo di ricerca e sviluppo dei nuovi farmaci. La durata del percorso è aumentata notevolmente dagli anni 60. Il percorso medio è superiore ai 10 anni dalle prime fasi di ricerca all'approvazione. IND: *Investigational New Drug*; CTA: *Clinical Trial Application*; NDA: *New Drug Application*; MAA: *Marketing Authorization Application*.

tervenire in maniera mirata sulla malattia con la terapia più appropriata in termini di efficacia e sicurezza. La farmacologia *à la carte*, di cui si è già accennato, dovrà però tener conto di alcuni limiti oggettivi: la maneggevolezza, i costi, la tutela della *privacy* dei pazienti. Tutte le nuove tecnologie e le innovazioni terapeutiche dovranno infatti considerare che, al di là del valore scientifico, al centro

della terapia c'è il paziente con la sua richiesta di rimedi da un lato efficaci e dall'altro economici e semplici.

Ringraziamenti

Si ringrazia Barbara Gallone per il suo contributo prezioso nella ricerca documentale e nella revisione accurata del testo.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'impegno per la ricerca di nuovi farmaci è significativo e richiede investimenti e risorse sempre maggiori.
- ▶ I risultati sembrano emergere lentamente, ma occorre considerare che il processo di ricerca e sviluppo ha tempi molto lunghi.
- ▶ I progressi scientifici e le innovazioni tecnologiche sono determinanti per conseguire risultati rilevanti.
- ▶ L'approccio più avanzato e promettente è multidisciplinare (chimica, biologia, biotecnologia, genetica, informatica, clinica).
- ▶ Le autorità sanitarie internazionali hanno definito criteri rigorosi per ottenere farmaci sicuri.
- ▶ Il prossimo decennio vedrà certamente farmaci innovativi in grado di trattare malattie che oggi non trovano ancora risposte terapeutiche efficaci.

Bibliografia essenziale

- ▶ Abraham DJ, Rotella DP (eds). *Burger's Medicinal Chemistry: Drug discovery and development*. 7th ed. 8 Volume set. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, 2010.
- ▶ Bleicher KH, Bohm HJ, Muller K, Alanine AI. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:369-78.
- ▶ Braun MM, Farag-El-Massah S, Xu K, Coté TR. Emergence of orphan drugs in the United States: a quantitative assessment of the first 25 years. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:519-22.
- ▶ Cavagnaro JA (ed). *Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals: a science-based approach to facilitating clinical trials*. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons, 2008.
- ▶ Cuatrecasas P. Drug discovery in jeopardy. *J Clin Invest* 2006;116:2837-42.
- ▶ Di Masi JA, Grabowski HG. The cost of biopharmaceutical R&D: is biotech different? *Managerial Dec Econ* 2007;28:469-79.
- ▶ Ernst & Young. *BioItaly Report 2010: Report on biotechnologies in Italy*. Milan: Assobiotec, 2010.
- ▶ Fumero S. Ricerca e sviluppo nell'industria biotecnologica e farmaceutica. I ed. Torino: Bollati Boringhieri, 2003.
- ▶ Heemstra HE, de Vreeh RLA, van Weely S et al. Orphan drug development across Europe: bottlenecks and opportunities. *Drug Discov Today* 2008;13:670-6.
- ▶ Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philgott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 2011;162:1239-49.
- ▶ Jacobson-Kram D, Keller KA (eds). *Toxicological testing handbook: principles, applications and data interpretation*. 2nd ed. New York: Informa Healthcare, 2006.
- ▶ Kramer JA, Sagartz JE, Morris DL. The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:636-49.
- ▶ Li JW-H, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 2009;325:161-5.
- ▶ McGrath JC, Bond RA, Mackie RM (eds.) A Special issue celebrating the life and work of James Whyte Black. *Br J Pharmacol* 2010;160 (Suppl 1):S1-S64.
- ▶ Munos B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:959-68.
- ▶ Pereira DA, Williams JA. Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol* 2007;152:53-61.
- ▶ Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. *Pharmaceutical Industry Profile 2010*. Washington DC: PhRMA, 2010.
- ▶ Sakamoto JH, van de Ven AL, Godin B et al. Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmacol Res* 2010;62:57-89.
- ▶ Williams M. Productivity shortfalls in drug discovery: contributions from the preclinical sciences? *J Pharmacol Exp Therap* 2011;336:3-8.

Sitologia

- ▶ Assobiotec: www.assobiotec.it
- ▶ Ernst & Young : www.ey.com
- ▶ European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations: www.efpia.org
- ▶ European Pharmaceutical Regulations and Innovation Systems: www.epris.org
- ▶ Farindustria: www.farindustria.it
- ▶ Food and Drug Administration (FDA): www.fda.gov
- ▶ European Medicines Agency (EMA): www.emea.europa.eu
- ▶ Pharmaceutical Manufacturers of America : www.phrma.org
- ▶ Worldwide Protein Data Bank: www.wwpdb.org/stats.html

Metodologia della sperimentazione clinica dei farmaci

CAPITOLO

4

Carlo Patrono

Obiettivi formativi

- Acquisire le nozioni fondamentali sul percorso di ricerca e sviluppo di un nuovo farmaco
- Acquisire i concetti base e le parole chiave delle diverse fasi della sperimentazione clinica di un farmaco
- Acquisire le basi teoriche e pratiche per saper leggere e analizzare criticamente gli studi osservazionali e i trial clinici randomizzati, come strumenti per valutare l'efficacia e la sicurezza dei farmaci

La terapia farmacologica come scienza è basata fondamentalmente sull'attenta valutazione del paziente e sull'analisi critica delle prove di efficacia e sicurezza del trattamento ("evidenza"). L'evidenza che fornisce la base per le scelte terapeutiche è quella che deriva da trial clinici controllati e randomizzati di buona qualità (ciò che si configura come grado "A" di evidenza nella maggior parte delle linee guida). Poiché possono passare alcuni anni tra l'immissione in commercio di un nuovo farmaco e il suo inserimento nelle linee guida di riferimento per una certa patologia, è importante che il medico sia in grado di valutare autonomamente l'evidenza, così come viene proposta dalla pubblicazione degli studi di fase 3, anche per rispondere agli inevitabili quesiti che verranno posti – in tempo reale – dai suoi pazienti esposti alle stesse notizie (soprattutto quelle molto promettenti o molto preoccupanti) riportate dai media in contemporanea alla pubblicazione del lavoro sul *New England Journal of Medicine* o su *Lancet*. Sviluppare la capacità critica di analizzare – nell'interesse del paziente – il nuovo pezzo di evidenza richiede l'apprendimento di un metodo (sperabilmente prima della laurea) e la sua applicazione sistematica. Infatti, l'analisi di un singolo trial clinico sta alla metodologia degli studi clinici come l'esame obiettivo di un singolo paziente sta alla semeiotica medica. Molto semplicemente, si impara a leggere i trial clinici dei farmaci leggendoli, così come si impara a guidare l'automobile guidandola. A meno che non si voglia delegare a qualcun altro questo compito, attendendo la prossima visita dell'informatore dell'azienda che produce il nuovo farmaco o l'esperto che – tipicamente all'interno di un convegno sponsorizzato dall'azienda – ci spiegano come va letto

e interpretato il trial clinico che ne documenta efficacia e sicurezza. Posizioni rispettabilissime, ma non scovre da potenziali conflitti d'interesse.

La ricerca e lo sviluppo di un nuovo farmaco

Nel percorso per ottenere un farmaco ci sono due fasi ben distinte: la ricerca e lo sviluppo (R e S; in inglese, *Research & Development*, R&D). La ricerca è l'invenzione, l'esplorazione di nuove molecole che nella prima fase si selezionano e di cui poi gradualmente si approfondisce il profilo. Se la nuova molecola è attiva sui modelli sperimentali più predittivi, se non induce effetti preoccupanti su altri organi o sistemi e se soddisfa i requisiti di biodisponibilità, allora la nuova molecola diventa candidata per essere un farmaco e passa alle fasi di sviluppo. Con lo sviluppo essa viene avviata agli studi di tossicologia per valutarne la sicurezza e quindi agli studi sull'uomo: un percorso a ostacoli, lungo e costoso. Durante lo sviluppo vengono seguiti schemi sperimentali e programmi definiti dalle normative internazionali in materia di sicurezza dei farmaci e della sperimentazione clinica. Invece la ricerca spazia in campi più liberi. Nuove idee nascono da ricerche di frontiera, che tengono conto delle ultime tecnologie e seguono quindi un percorso flessibile, variabile nel tempo. Così, oggi, nei laboratori si fa ricerca con approcci molto diversi rispetto a quanto si facesse solo dieci anni fa. Il processo di ricerca e sviluppo per condurre all'approvazione di un farmaco è assai lungo, selettivo e costoso (Figura 4.1) e ha prodotto in questi anni un cambiamento importante nell'organizzazione industriale ed economica delle aziende farmaceutiche (vedi Capitolo 3).

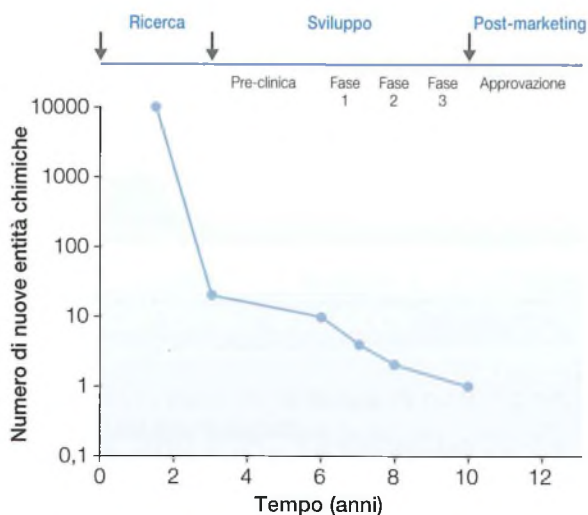


FIGURA 4.1 Le fasi, i tempi e le perdite di nuove entità chimiche che caratterizzano la scoperta e la commercializzazione di un nuovo farmaco.

Fasi della sperimentazione clinica

Come si sperimenta un farmaco sull'uomo

Nonostante l'accuratezza dei dati raccolti nei vari modelli di laboratorio, sia in termini di efficacia che di sicurezza, è necessario studiare i nuovi potenziali farmaci anche nell'uomo, attraverso un percorso di sperimentazione clinica. L'indagine nell'uomo è prevista dalla legislazione internazionale e va impostata secondo criteri rigorosi. Come per la tossicologia, anche per la sperimentazione clinica è avvenuta una significativa evoluzione negli ultimi 50 anni.

Negli anni 60 venne promulgata la Dichiarazione di Helsinki: un documento fondamentale nella ricerca biomedica, con il quale si definirono, fra l'altro, i principi etici della sperimentazione e la necessità del consenso da parte dei soggetti che partecipano allo studio. Nello stesso periodo l'ente regolatorio degli Stati Uniti, la *Food and Drug Administration* (FDA), introdusse protocolli di ricerca clinica controllata prevedendo l'uso del placebo (cioè l'uso di una sostanza farmacologicamente inerte in un gruppo di pazienti): un passo fondamentale verso un metodologia scientifica più valida per raggiungere conclusioni rigorose sull'efficacia e sicurezza dei farmaci. Un ulteriore progresso avvenne alla fine degli anni 80 con l'adozione, prima negli USA e poi a seguire negli altri Paesi, delle *Good Clinical Practices* (GCP). Le GCP sono linee guida per la stesura di protocolli che sanciscono modi, responsabilità e aspetti operativi e consentono una corretta conoscenza della sperimentazione clinica al fine di garantire due aspetti fondamentali: uno prevalentemente etico, e cioè il rispetto dei diritti del malato, e l'altro di carattere scientifico, e cioè la veridicità dei risultati della ricerca. Al centro di queste linee guida si trovano

il "consenso informato" (cioè la libertà di ogni soggetto di partecipare alla ricerca clinica, dopo aver acquisito sufficienti informazioni sulle sue finalità e sui potenziali rischi associati al trattamento sperimentale) e il Comitato Etico (organo indipendente che ha il compito di valutare e garantire il contenuto etico e scientifico dello studio a salvaguardia dei diritti e della sicurezza dei soggetti della sperimentazione). Con l'adozione delle GCP si è diffusa una maggiore consapevolezza dei principi guida della sperimentazione clinica. A questo va aggiunta la necessità di studiare farmaci a livello internazionale con la partecipazione di pazienti distribuiti nei vari Paesi. Il risultato finale è che oggi i farmaci vengono studiati in un elevato numero di pazienti (in genere diverse migliaia) adottando con criteri rigorosi lo stesso protocollo sperimentale. Da segnalare che accanto alle aziende farmaceutiche e di biotecnologia che gestiscono gli studi clinici presso vari Centri specialistici (ospedali, cliniche universitarie) sono emerse negli ultimi anni organizzazioni specializzate in ricerche cliniche (*Contract Research Organizations*, CRO) che si dedicano alla pianificazione, alla gestione e al monitoraggio della sperimentazione clinica (vedi CD: Approfondimento 4.1. *Glossario di metodologia di ricerca clinica*). Una molecola candidata per diventare un farmaco va sperimentata sull'uomo. Una volta disponibili il profilo farmacologico e i risultati dei primi studi tossicologici, se vengono soddisfatte le condizioni preliminari di efficacia e sicurezza, si chiede alle autorità regolatorie di poter iniziare gli studi clinici.

Negli Stati Uniti si sottopone la documentazione (*Investigational New Drug application*, IND) alla FDA, l'organo di controllo per i medicinali e gli alimenti. In Europa, la documentazione viene inviata, per essere esaminata, ai Ministeri della Sanità dei singoli Paesi dove è in vigore una normativa in materia. In questa fase ha importanza critica il parere del Comitato Etico delle varie strutture ospedaliere nelle quali si effettua la sperimentazione.

Il percorso di sviluppo clinico di un nuovo farmaco è contrassegnato tradizionalmente da quattro fasi

La *fase 1* ha come obiettivo l'accertamento della tollerabilità e della farmacocinetica, generalmente in un numero limitato di soggetti sani volontari. Per i farmaci oncologici la fase 1 viene condotta nei pazienti portatori di neoplasie, in considerazione della potenziale tossicità midollare di farmaci antiproliferativi.

La *fase 2* è finalizzata alla caratterizzazione dell'effetto farmacodinamico atteso e alla definizione della relazione dose-risposta nei pazienti (diverse centinaia fino ad alcune migliaia) portatori della patologia d'interesse, con l'obiettivo di definire la dose (o al più due dosi) da utilizzare in fase 3. *End-point* primario degli studi di fase 2 è di solito rappresentato da misure "surrogate" di efficacia e/o di sicurezza, ma le dimensioni degli studi di fase 2 non sono sufficienti per valutare né l'una né l'altra. La *fase 3* valuta l'efficacia (*end-point primario*) e la sicurezza (di solito, uno degli *end-point secondari*). Le dimensioni di questi studi (da alcune centinaia di pazienti in campo oncologico ad alcune decine di migliaia in campo cardio-

vascolare) consentono – di solito – di valutare attendibilmente l'efficacia del nuovo farmaco rispetto a un placebo (nel caso in cui entrambi vengano aggiunti alla terapia standard) o nei confronti di un farmaco di provata efficacia in quella malattia. Diversamente, l'accertamento della sicurezza di un nuovo trattamento farmacologico può essere fatto soltanto in maniera preliminare negli studi di fase 3 e deve continuare dopo la eventuale approvazione e commercializzazione del farmaco nella cosiddetta fase 4. Gli studi di fase 4 possono essere di natura osservazionale (quelli finalizzati all'ulteriore valutazione della sicurezza) o – come nella fase 3 – di disegno controllato e randomizzato per esplorare l'efficacia del farmaco in nuove potenziali indicazioni.

La valutazione dei risultati della fase 3 è affidata alle autorità regolatorie: EMA in Europa, FDA in USA

Dopo la commercializzazione, il posto del nuovo farmaco nell'armamentario terapeutico e nella pratica clinica viene definito da una serie di processi gestiti da soggetti diversi rispetto a quelli che hanno gestito le fasi precedenti dello sviluppo clinico. Il primo processo è rappresentato dal recepimento da parte delle autorità regolatorie locali (l'Agenzia Italiana del Farmaco [AIFA] nel nostro Paese) delle decisioni dell'EMA (*European Medicines Agency*) in termini di indicazione(i) approvata(e) e, soprattutto, in termini di scelte autonome per quanto attiene la rimborsabilità del nuovo farmaco e la sua fascia di prescrivibilità nell'ambito del Sistema Sanitario Nazionale. Il secondo processo riguarda l'inserimento del nuovo farmaco nei prontuari terapeutici regionali e nei prontuari terapeutici ospedalieri. Il terzo processo riguarda l'aggiornamento da parte di gruppi di esperti e/o società scientifiche delle linee guida terapeutiche per incorporare in specifiche raccomandazioni l'evidenza riguardante l'efficacia e la sicurezza del nuovo farmaco.

Studi osservazionali e trial clinici randomizzati

Gli studi clinici finalizzati alla valutazione dell'efficacia e/o della sicurezza dei farmaci possono essere di natura osservazionale o randomizzata.

Gli studi osservazionali consentono di stabilire un'associazione tra l'esposizione al farmaco e il verificarsi (con maggiore o minore frequenza) di un certo evento, ma non consentono di stabilire che esista una relazione causa/effetto tra i due

Gli studi osservazionali (di popolazione o di coorte) registrano le possibili associazioni tra esposizione a un farmaco (ad esempio, aspirina) o a una classe di farmaci (ad esempio, farmaci antinfiammatori non steroidei, FANS) e il verificarsi di eventi sfavorevoli (ad esempio, sanguinamenti del tratto gastrointestinale superiore o infarto miocardico) che portano al ricovero ospedaliero del soggetto esposto. Attraverso un confronto tra il rischio

di tali eventi in soggetti esposti e quello di soggetti non esposti, è possibile suggerire che il trattamento farmacologico con aspirina aumenti i sanguinamenti gastro-intestinali, ma diminuisca gli eventi coronarici. Tuttavia questa osservazione è soggetta a molteplici fattori di confondimento poiché i soggetti esposti e quelli non esposti all'aspirina non sono necessariamente confrontabili tra di loro, potendo differire in una serie di variabili (note o sconosciute) in grado di influenzare gli eventi misurati, indipendentemente dal trattamento. Inoltre, l'accuratezza delle informazioni sull'uso dei farmaci (compresa la durata e la dose giornaliera) che vengono desunte da banche dati computerizzate può essere molto diversa negli studi osservazionali che si trovano in letteratura. Nonostante queste limitazioni, un riscontro replicato in più studi di un rischio relativo superiore a 2 per una complicanza grave deve essere preso molto seriamente nella valutazione integrata del profilo beneficio/rischio di un farmaco. Nell'ambito dell'accertamento di effetti collaterali che si verificano con una bassa incidenza (ad esempio, 0,1-1% dei soggetti trattati) gli studi osservazionali hanno svolto e continuano a svolgere un ruolo fondamentale. Tuttavia, l'accertamento dell'efficacia di un nuovo farmaco è appannaggio esclusivo degli studi clinici randomizzati. Le numerose osservazioni circa un apparente effetto protettivo dell'aspirina e di altri FANS nei confronti del carcinoma colo-rettale, con un rischio relativo compreso tra 0,5 e 0,7 (che suggerisce una riduzione del rischio del 30-50%), non sono sufficienti a consentire un'approvazione regolatoria di una nuova indicazione per questi farmaci, né a giustificare linee guida che suggeriscano l'impiego chemopreventivo degli stessi. Proprio perché non siamo in grado di escludere che una terza variabile X a noi sconosciuta (o comunque non misurata) spieghi sia l'uso di FANS che un minore rischio di carcinoma colo-rettale. Tuttavia, nel caso specifico, la numerosità e la consistenza degli studi osservazionali pubblicati nel corso degli ultimi 30 anni (insieme con la ricerca pre-clinica sul ruolo di COX-1 e COX-2 nella cancerogenesi colo-rettale) hanno fornito un solido razionale per l'avvio di studi clinici randomizzati di aspirina e coxib, per valutare efficacia e sicurezza di questo approccio chemopreventivo. In circostanze particolari che non consentano l'esecuzione di trial clinici randomizzati verso placebo, come ad esempio nel caso dei farmaci utilizzati nella contraccezione ormonale, gli studi osservazionali di coorte hanno rappresentato l'unica sorgente di informazione circa la sicurezza dei contraccettivi orali. Le diatribe decennali circa potenziali associazioni tra uso di questi farmaci e ridotta o aumentata incidenza di alcuni tumori femminili riflettono le incertezze interpretative sopra discusse.

Il trial clinico randomizzato e controllato rappresenta lo strumento fondamentale per l'accertamento dell'efficacia di un nuovo (o vecchio) farmaco e per la valutazione preliminare della sua sicurezza

La randomizzazione consiste nell'affidare l'assegnazione di un paziente (selezionato sulla base di criteri di inclusio-

ne e di esclusione previsti dal protocollo) al trattamento sperimentale o al trattamento di controllo (placebo o trattamento standard per quella patologia) sulla base di una sequenza di numeri *random*. In questo modo, il paziente ha le stesse probabilità di essere assegnato al trattamento sperimentale o al trattamento di controllo. L'importanza della randomizzazione (se effettuata correttamente su un numero congruo di pazienti) consiste nel garantire che tutte le variabili in gioco che potrebbero influenzare gli eventi prescelti come *end-point primari* siano egualmente distribuite nei due gruppi di trattamento (proprio perché distribuite in maniera casuale) e che quindi i due gruppi di pazienti siano assolutamente confrontabili tra di loro, sia per le variabili misurate (che ci consentono di verificare il successo della randomizzazione) che – presumibilmente – per quelle non misurate.

L'importanza del gruppo di controllo consiste nel descrivere l'andamento naturale della malattia e delle sue complicanze, nelle condizioni standard del momento storico e del contesto socio-economico nei quali viene effettuato lo studio. Pertanto, il gruppo di controllo può essere rappresentato da pazienti trattati con un placebo (ovviamente aggiunto a tutti i trattamenti di provata efficacia in quella patologia; vedi **CD**: Approfondimento 4.2. *Il placebo*), o con un farmaco di riferimento per la classe terapeutica cui appartiene il nuovo farmaco (ad esempio, il clopidogrel per lo studio di un nuovo antiaggregante inibitore del recettore P2Y₁₂). Il concetto di controllo ai fini della interpretazione di qualunque intervento sperimentale dovrebbe rappresentare parte fondante del bagaglio culturale di una popolazione scientificamente orientata. Purtroppo, così non è uniformemente nella nostra società, come documentato dal successo – altrimenti inspiegabile – di pratiche terapeutiche basate su studi non controllati di farmaci della Medicina tradizionale (basti ricordare il caso Di Bella!) o di medicinali della Medicina "alternativa" (vedi **CD**: Approfondimento 1.1 *Terapie alternative o non convenzionali*).

L'importanza dell'ipotesi primaria

L'ipotesi primaria di un trial clinico d'intervento ha due componenti: a) quella fisiopatologica (quale mediatore, quale enzima o recettore ipotizziamo sia rilevante nel determinismo di una certa complicanza della malattia), che ci porta a scegliere un determinato *tool* farmacologico per la sua verifica; b) quella inerente l'effetto atteso, in termini sia qualitativi (che cosa ci aspettiamo di modificare) che quantitativi (in che misura rispetto al controllo). Da un intervento farmacologico di prevenzione cardiovascolare, ci aspettiamo che modifichi la storia naturale del processo aterosclerotico (ad esempio, attraverso studi di *imaging* carotideo o coronarico in fase 2) o le sue complicanze serie (gli eventi aterotrombotici coronarici e cerebrali in fase 3), in misura clinicamente rilevante rispetto alla terapia standard. Nella fase 3 della sperimentazione clinica di un nuovo farmaco è possibile scegliere tra due diverse strategie di valutazione dell'efficacia clinica: 1) dimostrare la superiorità del nuovo farmaco rispetto al *gold standard* della stessa classe (ad esempio, confrontando un nuovo

antiaggregante piastrinico verso aspirina); 2) dimostrare effetti additivi del nuovo farmaco somministrato in associazione con il *gold standard* della stessa classe (nuovo antiaggregante più aspirina verso aspirina).

La verifica della validità dell'ipotesi primaria può essere compromessa da molteplici fattori

Tra questi, sembra utile considerare una sopravvalutazione dell'importanza di un determinato meccanismo di malattia, oppure il verificarsi di effetti "off-target" del farmaco sperimentale che mascherano parzialmente o completamente il suo potenziale beneficio clinico. Esempio della prima evenienza è rappresentato dall'insuccesso recente di un antagonista del recettore del trombossano A₂ (TP), terutroban, di cui non è stato possibile dimostrare la superiorità rispetto all'aspirina a basse dosi in uno studio di fase 3 (PERFORM) di circa 19.000 pazienti con un recente episodio cerebrovascolare di natura ischemica. Probabilmente, l'importanza fisiopatologica di agonisti del recettore TP insensibili a basse dosi di aspirina (ad esempio, alcuni F₂-isoprostani) nella genesi dell'ictus cerebrale è inferiore a quella ipotizzata. Esempio della seconda evenienza è rappresentato dall'insuccesso recente di un inibitore della *Cholesteryl Ester Transfer Protein* (CETP), torcetrapib, nel ridurre gli eventi vascolari maggiori in uno studio di fase 3 (ILLUMINATE) di circa 15.000 pazienti ad alto rischio. Probabilmente, un effetto *off-target* del torcetrapib sulla pressione arteriosa è responsabile di questo insuccesso.

Definizione dell'end-point primario e sua importanza per stabilire la validità di un trial

L'*end-point primario* di un trial clinico rappresenta la variabile (biochimica, funzionale o clinica) o l'insieme di variabili (ad esempio, un insieme di eventi vascolari maggiori come l'infarto miocardico, l'ictus cerebrale e la morte per cause vascolari) scelta(e) dagli sperimentatori come parametro di cui misurare le variazioni (nel caso di una variabile continua, come il livello di colesterolo o il livello pressorio) o la frequenza (nel caso di un evento che complichino la storia naturale della malattia), in funzione del trattamento randomizzato. Negli studi di fase 1, l'*end-point primario* è rappresentato da parametri ematochimici e farmacocinetici. Negli studi di fase 2, vengono abitualmente valutati *end-point* farmacodinamici. Negli studi di fase 3/4, l'*end-point primario* è rappresentato da eventi di chiara rilevanza clinica per una determinata patologia (ad esempio, complicanze aterotrombotiche e/o mortalità). La definizione dell'*end-point primario* (e di quelli secondari) nel protocollo di studio rappresenta una dichiarazione d'intenti e un vincolo, nel senso che è sulla differenza di quel parametro che saranno valutate l'efficacia e/o la sicurezza di un trattamento sperimentale e non su altri parametri. È importante valutare criticamente la natura dell'*end-point primario* di efficacia, perché non sempre si tratta di reali indicatori di efficacia clinica. Ad esempio, la valutazione del tempo alla progressione

della malattia neoplastica e della sopravvivenza libera da progressione viene utilizzata in studi clinici di fase 2/3 di nuovi farmaci antitumorali come "surrogato" della sopravvivenza complessiva dei pazienti, e capita non di rado di vedere approvati nuovi farmaci sulla base di un singolo studio – relativamente piccolo – che utilizza questi end-point surrogati, non perché questo sia scientificamente giustificato ma principalmente a causa delle pressioni psicologiche e di altra natura che operano sulle autorità regolatorie in campo oncologico. La recente revoca da parte della FDA dell'indicazione del bevacizumab (Avastin™) per il carcinoma mammario (approvata sulla base di un singolo studio di questo tipo) è esemplificativa dei potenziali fallimenti di questo approccio.

End-point surrogati sono anche la misurazione della pressione arteriosa (per nuovi farmaci antipertensivi), della glicemia e dell'emoglobina glicata (per nuovi farmaci antidiabetici) o dei livelli di mRNA virale nel plasma (per nuovi farmaci antiretrovirali). Il valore predittivo di questi end-point surrogati nei confronti degli outcome clinici è variabile e due farmaci che hanno lo stesso effetto su un end-point surrogato possono avere effetti molto diversi sull'outcome clinico.

Un trial clinico va giudicato in base ai risultati riguardanti l'end-point primario nell'intera popolazione di pazienti randomizzati

Se la differenza osservata nell'incidenza dell'end-point primario tra gruppo sperimentale e gruppo di controllo è statisticamente significativa, questo è un risultato positivo. Se non lo è, questo è un risultato negativo (o comunque non interpretabile in maniera univoca, perché i limiti dell'intervallo di confidenza al 95% del rischio relativo sono uno al di sotto e uno al di sopra dell'unità, indicando che i risultati sono compatibili sia con un'ipotesi di riduzione del rischio dell'evento scelto come end-point primario che con un'ipotesi di aumento del rischio). In questo caso, tutto quello che leggiamo sugli end-point secondari e nelle analisi per sottogruppi non ha alcun valore (se non quello descrittivo e di generatore di nuove ipotesi), anche se enfatizzato dagli autori dello studio nel tentativo di far passare come positivo uno studio negativo. La ragione di questa affermazione di principio è che il calcolo della dimensione del campione è stato fatto sull'end-point primario e non su quelli secondari. Inoltre, quanto più grande è il numero di questi tanto maggiore è la probabilità che una differenza apparentemente significativa in un end-point secondario si verifichi per caso. Le analisi per sottogruppi hanno scarso valore perché scardinano il meccanismo della randomizzazione (a meno che la variabile d'interesse non sia stata identificata a priori e i pazienti stratificati in base a questa variabile) e perché, esaminando più piccoli numeri di pazienti (e di eventi) rispetto all'intera popolazione, perdono il potere statistico di cui era dotato lo studio nel suo insieme. Inoltre, quanti più sottogruppi vengono esaminati tanto più aumenta la probabilità che uno di questi si comporti in maniera difforme dal risultato complessivo nell'intera popolazione studiata, per il gioco del caso. Esempio in tal senso è l'analisi per sottogruppi

in base al segno zodiacale di nascita dei pazienti arruolati nello studio ISIS-2 (*Lancet* 1988;2:349-60), che suggeriva che i pazienti con infarto acuto nati sotto il segno dei gemelli o della bilancia non fossero protetti dall'aspirina, rispetto a un risultato complessivo di riduzione della mortalità di circa un quarto nell'intera popolazione studiata di oltre 17.000 pazienti. Un'analisi analoga (non pubblicata) fatta sul *Physicians' Health Study* suggeriva che la capacità dell'aspirina di prevenire un primo infarto in circa 22.000 medici americani di genere maschile fosse compromessa nei nati sotto il segno dello scorpione, ma chiaramente dimostrabile in tutti gli altri (compresi quelli nati sotto il segno dei gemelli e della bilancia).

Laddove tendiamo a sorridere di fronte a questi risultati, la tendenza prevalente è a prendere molto seriamente i risultati delle analisi per sottogruppi, particolarmente quando soddisfano certe aspettative di carattere fisiopatologico o sono in linea con i dogmi dominanti in un certo campo. In realtà, i risultati delle analisi per sottogruppi hanno lo stesso valore, che si tratti di segni zodiacali o di sofisticati *marker* biochimici o genetici. La stima più attendibile del beneficio del trattamento sperimentale in un particolare sottogruppo di pazienti di nostro interesse ce la dà il risultato complessivo (se positivo) applicato proporzionalmente ai pazienti di quel sottogruppo. Se facciamo a fette una torta di cioccolato, ci dobbiamo aspettare che ogni fetta (anche la più sottile) sia di cioccolato e sorprenderci fortemente del contrario.

Il calcolo corretto della dimensione del campione è essenziale per testare l'ipotesi di uno studio

La sezione statistica di un trial clinico e l'analisi statistica dei suoi risultati incute un certo timore reverenziale, dietro il quale spesso ci si trincerava per non leggerli. In realtà, non c'è bisogno di particolari nozioni di statistica per guardare (è importante farlo) com'è stato fatto il calcolo della dimensione del campione. Perché le ipotesi che sono state formulate dagli autori in termini di frequenza attesa dell'end-point primario nel gruppo di controllo e di differenza attesa tra i due trattamenti randomizzati (le due variabili che concorrono al dimensionamento dello studio) ci aiuteranno a leggere e interpretare i risultati, confrontando l'atteso con l'osservato. Questo esercizio sarà particolarmente utile nei confronti di un risultato negativo, perché questo spesso dipende da ipotesi sbagliate (poco realistiche) fatte nel calcolo della dimensione del campione. Ovviamente, quanto più bassa è la frequenza attesa dell'end-point primario nel gruppo di controllo e quanto più piccola è la differenza ipotizzata tra i due gruppi di trattamento, tanto maggiore sarà la dimensione del campione necessaria per testare l'ipotesi primaria dello studio. Formule statistiche relativamente semplici consentono di calcolare il potere statistico dello studio, e cioè la probabilità (che dovrebbe essere nell'ordine dell'80-90%) di dimostrare come statisticamente significativa la differenza ipotizzata. La scelta della dimensione del campione rappresenta – a volte – un compromesso tra la plausibilità biologica della differenza attesa e il costo del trial clinico. È chiaro che ipotizzando che un nuovo farmaco antiag-

gregante piastrinico riduca il rischio di eventi vascolari maggiori del 50% rispetto all'aspirina, sarà necessario un numero relativamente piccolo (circa un migliaio) di pazienti per testare questa ipotesi. Tuttavia, data la natura multifattoriale dell'aterotrombosi, questa ipotesi non è biologicamente plausibile. Più verosimilmente, il nuovo farmaco potrebbe ridurre il rischio del 10-15% rispetto al trattamento standard. Per testare questa ipotesi più conservativa (e biologicamente plausibile) occorrono circa 20.000 pazienti. Gli interessi della comunità medicoscientifica e quelli delle aziende farmaceutiche non sono sempre necessariamente coincidenti. Compito specifico dei Comitati Etici è quello di verificare che il "compromesso" raggiunto per conciliare la plausibilità biologica dell'ipotesi con il costo dello studio sia compatibile con la tutela degli interessi dei pazienti. C'è una quantità impressionante di trial clinici con risultati negativi o non conclusivi, che si possono, spesso, spiegare con un'ipotesi primaria poco plausibile e/o con una dimensione dell'effetto atteso poco realistica. Gli effetti collaterali gravi subiti, inutilmente, dai pazienti nell'ambito di trial clinici "sbagliati" non vanno considerati alla stregua di una catastrofe naturale, ma pensati come errori medici largamente evitabili.

Analisi dei risultati

L'analisi dei risultati va incentrata sul rischio relativo (RR) dell'end-point primario, cioè il rapporto tra la frequenza nel gruppo sperimentale e quella nel gruppo di controllo

Questo numero se inferiore a 1 indica una riduzione del rischio (ad esempio, un $RR=0,85$ indica una riduzione relativa del rischio del 15%), se superiore a 1 indica un aumento del rischio (ad esempio, un $RR=1,25$ indica un aumento del rischio del 25%). Questo numero rappresenta una stima "puntuale" del rischio relativo di un trattamento verso l'altro; la statistica ci aiuta a capire l'incertezza che c'è intorno a questa stima puntuale, attraverso l'intervallo di confidenza al 95%. Gli estremi di questo intervallo ci fanno capire se la differenza osservata tra i due trattamenti è statisticamente significativa (quando gli estremi sono entrambi inferiori a 1, nel caso di un trattamento sperimentale efficace nel prevenire gli eventi che compongono l'end-point primario) oppure no. Quanto più stretto è l'intervallo e, soprattutto, quanto più lontano dall'unità ($RR=1$ significa identità tra i due trattamenti) è il limite superiore dell'intervallo tanto più avremo confidenza nella stima puntuale. Il valore di P è un valore di probabilità e ci dice quali sono le probabilità che la differenza osservata sia dovuta al caso e non al diverso trattamento randomizzato; per convenzione, si accetta una probabilità inferiore al 5% che corrisponde a un $P < 0,05$.

Nell'analizzare i risultati del trial in termini di sicurezza del nuovo farmaco rispetto al controllo dovremo tener conto che gli effetti collaterali gravi hanno una frequenza relativamente bassa e che il calcolo della dimensione del campione è stato fatto su una frequenza attesa di eventi

dell'end-point primario di efficacia – di solito – più alta. Quindi, lo studio, anche grande, non ha spesso un potere statistico adeguato per valutare attendibilmente differenze in eventi più rari. In questo caso, ponendoci sempre rispetto ai risultati dalla parte dei nostri pazienti, dovremo valutare seriamente anche differenze che non raggiungono la significatività statistica ma che riguardano complicanze gravi, soprattutto quando le differenze osservate sono biologicamente e farmacologicamente plausibili (ad esempio, una maggiore incidenza di complicanze emorragiche gravi associate all'uso di un trattamento antiaggregante o anticoagulante più efficace del controllo nel prevenire le complicanze trombotiche).

Come valutare il rapporto beneficio/rischio di un nuovo trattamento

Utilizzando il tasso annualizzato dell'outcome primario nei due gruppi, possiamo calcolare la riduzione assoluta del rischio o beneficio assoluto del trattamento e da questo ricavare il valore di NNT (*Number Needed to Treat*, o numero di pazienti necessario da trattare per evitare un evento). Ad esempio, se il tasso di eventi vascolari maggiori è del 10% per anno nel gruppo di controllo e dell'8% per anno nel gruppo sperimentale, il beneficio assoluto del trattamento consiste nell'evitare 2 eventi per 100 pazienti trattati per un anno con il farmaco sperimentale, o 20 per 1.000; dividendo $1.000:20$ si ottiene un $NNT=50$.

Facendo un'operazione analoga con il tasso annualizzato di eventi dell'end-point di sicurezza si può calcolare il valore di NNH (*Number Needed to Harm*, o numero di pazienti da trattare per causare un evento dannoso). Il confronto tra i valori di NNT e di NNH ci aiuta a valutare il bilancio tra potenziali benefici e potenziali rischi derivanti dall'applicazione del trattamento sperimentale a pazienti con caratteristiche analoghe a quelli reclutati nel trial clinico (spesso altamente selezionati, ad esempio, per essere ad alto rischio di complicanze aterotrombotiche e a basso rischio di complicanze emorragiche, nel caso in cui si confronti un nuovo antiaggregante piastrinico verso lo standard di riferimento).

Il limite maggiore di tutte le analisi fatte sopra è che derivano da una stima puntuale del rischio relativo di un singolo studio, con la sua incertezza statistica più o meno ampia. Al fine di ridurre questa incertezza e ottenere una stima più accurata degli effetti benefici (o dannosi) di un certo trattamento, si ricorre periodicamente a una metanalisi di tutti gli studi che hanno valutato lo stesso trattamento o trattamenti analoghi utilizzando lo stesso end-point primario. La metanalisi rappresenta uno strumento statistico per verificare se esista omogeneità o eterogeneità nella stima degli effetti di uno o più farmaci appartenenti alla stessa classe terapeutica, così come sono stati registrati in trial clinici diversi. In assenza di eterogeneità statisticamente significativa di queste diverse valutazioni dei benefici (o dei danni) del trattamento, la metanalisi fornisce una stima della dimensione dell'effetto che tiene conto dei risultati dei diversi studi. I risultati della metanalisi, in quanto basati su un numero più am-

pio di pazienti studiati e di eventi registrati, danno una stima più accurata (meno incerta) della reale dimensione degli effetti del trattamento.

Valutazione comparativa di benefici e rischi di un trattamento farmacologico

La somministrazione di qualunque farmaco comporta un rischio di effetti collaterali più o meno gravi. La loro valutazione quantitativa in assenza di un adeguato gruppo di controllo risulta elusiva, sia perché lo stato di malattia per il quale il farmaco viene somministrato può associarsi a disturbi soggettivi e complicità, sia perché anche la somministrazione di un placebo si accompagna a una variegata sintomatologia (nausea, vomito, dispepsia ecc.), in funzione delle risposte fisiologiche evocate dalle aspettative del paziente. Pertanto, l'accertamento degli effetti collaterali più frequenti (quelli che interessano >10% dei pazienti trattati) può essere fatto rigorosamente soltanto attraverso studi clinici controllati e randomizzati. Tuttavia, la bassa incidenza (ad esempio 0,1-1%) di effetti collaterali gravi può eludere la capacità di uno studio clinico randomizzato di dimostrare una differenza statisticamente significativa verso il gruppo di controllo per le considerazioni fatte nella sezione precedente. Il numero di anni-paziente di esposizione al nuovo farmaco durante i trial clinici di fase 3 è relativamente modesto rispetto all'esposizione al nuovo medicamento dopo la sua commercializzazione. Pertanto, aspetti importanti della tossicità di un nuovo (o vecchio) farmaco possono emergere anni o decenni dopo il suo utilizzo su larga scala. Basti pensare alle complicanze cardiovascolari dei FANS, largamente ignorate per alcuni decenni ed emerse soltanto in seguito alla introduzione di una nuova classe di inibitori della COX-2, i coxib, studiati per la prima volta in trial clinici di ampie dimensioni e di lunga durata. In questo caso, dopo i "segnali" di singoli studi del rofecoxib (prima il VIGOR, poi lo studio APPROVe che indusse la Merck a ritirarlo dal mercato), una metanalisi di tutti i trial clinici di 5 diversi coxib consentì di dimostrare che si trattava di un effetto di classe dipendente dal meccanismo d'azione di questi farmaci; di quantizzare con maggiore precisione le dimensioni del rischio di eventi vascolari maggiori (per lo più, l'infarto miocardico non fatale); e di suggerire – per la prima volta – che un rischio analogo fosse attribuibile ad alcuni FANS tradizionali di ampia utilizzazione.

Più problematico risulta il confronto del rischio relativo di una stessa complicanza grave associato all'uso di farmaci diversi della stessa classe. Negli studi osservazionali dei FANS tradizionali, il rischio relativo di complicanze emorragiche del tratto gastrointestinale superiore risultava sistematicamente più basso per alcuni farmaci (paracetamolo e ibuprofene) rispetto ad altri (diclofenac, naprossene ecc.) probabilmente perché le dosi giornaliere che i pazienti sceglievano di utilizzare erano più basse per gli uni rispetto agli altri. Tuttavia, la plausibilità che i FANS tradizionali – come classe – aumentino il rischio di queste complicanze

di 2-4 volte, così come suggerito dagli studi osservazionali, è supportata dai risultati dei trial randomizzati dei coxib verso FANS tradizionali che hanno dimostrato una riduzione del 50-75% nel rischio di eventi gastrointestinali maggiori associata all'uso dei primi rispetto ai secondi.

Nel confrontare i dati sulla sicurezza dei farmaci che derivano dagli studi osservazionali con quelli che possiamo desumere dai trial clinici randomizzati, è importante tener presente che gli studi osservazionali registrano il verificarsi di eventi in una popolazione generale di soggetti non selezionati in base a rigidi criteri di inclusione e di esclusione, così come invece avviene in un trial clinico randomizzato. Questi ultimi tendono a sotto-rappresentare alcuni fattori di rischio (ad esempio, l'età avanzata e la storia pregressa delle stesse complicanze) che possono amplificare gli effetti del trattamento farmacologico sull'outcome d'interesse, come dimostrato dagli studi osservazionali (Figura 4.2).

Nel caso dell'aspirina a basse dosi utilizzata in prevenzione primaria, una stima accurata del rischio di sanguinamenti extra-cranici maggiori è venuta da una metanalisi dei dati individuali dei circa 95.000 partecipanti randomizzati in 6 diversi trial clinici. Questa metanalisi ha dimostrato che i fattori di rischio per le complicanze emorragiche si sovrappongono per lo più ai fattori di rischio per le complicanze aterotrombotiche, suggerendo che il rapporto tra il numero di eventi vascolari evitati e il numero di sanguinamenti maggiori causati dal trattamento con aspirina rimanga sostanzialmente costante a livelli diversi di rischio cardiovascolare calcolato al momento dell'arruolamento (Figura 4.3).

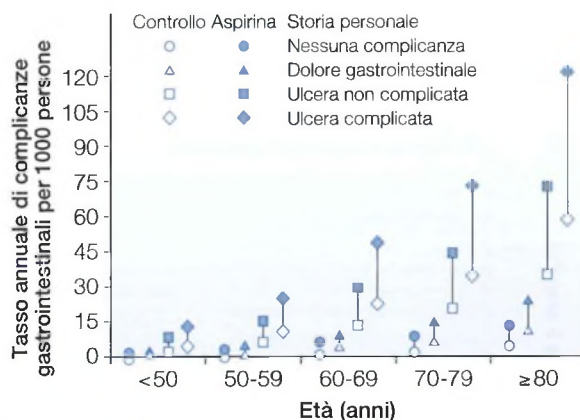


FIGURA 4.2 Stime del tasso annuale di complicanze gastrointestinali in soggetti di genere maschile, in relazione all'età, alla storia personale e all'uso di aspirina a basse dosi. Per ciascun decennio di età, i diversi simboli esprimono una diversa storia personale, come indicato all'interno della figura. I simboli vuoti descrivono i tassi di complicanze nella popolazione generale non trattata con aspirina, mentre i simboli pieni descrivono i tassi di complicanze associati all'uso regolare di aspirina a basse dosi. Le linee verticali che congiungono ciascuna coppia di simboli denotano l'eccesso assoluto di complicanze causate dall'aspirina in ciascun sottogruppo della popolazione trattata. (Da: Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005;353:2373-83, modificata)

Quindi, gli studi osservazionali, i trial clinici randomizzati e le metanalisi di questi studi sono strumenti fondamentali (e tra loro complementari) nella valutazione integrata dell'efficacia e sicurezza dei farmaci.

Uno sguardo al futuro

Favorire il rapido trasferimento dei modelli sperimentali al letto del malato

Storicamente, gli studi di fase I sono sempre stati eseguiti nel volontario sano (con le eccezioni notate sopra). Tuttavia, per il futuro si prospettano scenari diversi, con una progressiva sostituzione degli studi sul volontario a favore sia di un potenziamento di fasi di transizione pre-clinica/clinica in silico (con modellistica *ad hoc*), che di un maggior coinvolgimento del paziente nelle fasi precoci della sperimentazione clinica. Gli studi di fase I nel paziente presentano molteplici vantaggi: è infatti possibile eseguire all'interno di tali sperimentazioni anche delle valutazioni più squisitamente di tipo farmacodinamico, che permettano di: a) identificare *biomarker* precoci di risposta alla terapia; b) favorire il rapido trasferimento di nuove strategie terapeutiche dai modelli sperimentali animali alla clinica (translational medicine); c) esplorare nuovi meccanismi d'azione e/o nuove possibili proprietà terapeutiche (*studi proof of concept*). Non a caso, questo tipo di studi è oggi fortemente incentivato sia dalle case farmaceutiche (attraverso grant e call for proposal) che dall'AIFA attraverso i bandi per la ricerca indipendente. Questo tipo di studi presenta vantaggi considerevoli anche nel caso di farmaci indirizzati alle patologie rare per molte delle quali, in assenza di reali trattamenti terapeutici, vi è necessità di determinare in tempi rapidi

la possibile efficacia di potenziali nuovi farmaci (*Position Paper* della Società Italiana di Farmacologia, 2010).

Rendere più efficiente la verifica dell'efficacia clinica

Per quanto riguarda le fasi successive dello sviluppo clinico, è auspicabile uno sforzo concertato della comunità medico-scientifica, dell'industria farmaceutica e delle autorità regolatorie per rendere più efficiente la verifica dell'efficacia e sicurezza di nuovi farmaci attraverso lo sviluppo di biomarker (molecolari o genetici) in grado di identificare sottogruppi di pazienti particolarmente suscettibili agli effetti benefici o a quelli dannosi di un trattamento sperimentale. Una iniziativa congiunta della Commissione Europea e dell'Associazione Europea delle Industrie Farmaceutiche (EFPIA) all'interno del 7° Programma Quadro, la *Innovative Medicines Initiative* (IMI), va in questa direzione finanziando progetti di ricerca finalizzati allo sviluppo di *biomarker* in grado di predire efficacia e/o tossicità dei farmaci (www.imi.europa.eu).

Rendere più rapido il processo di approvazione di farmaci altamente "specializzati"

Alcuni oncologi sostengono la necessità che l'approvazione di farmaci antitumorali innovativi avvenga sulla base di studi di fase I con risultati particolarmente brillanti in sottogruppi di pazienti selezionati per essere portatori di alterazioni genetiche/molecolari che il farmaco "highly targeted" è in grado di modificare (Chabner, 2011). Le implicazioni etiche e regolatorie di un processo accelerato di approvazione di questi farmaci in ambito oncologico dovrebbero diventare argomenti prioritari di un'agenda per il futuro.

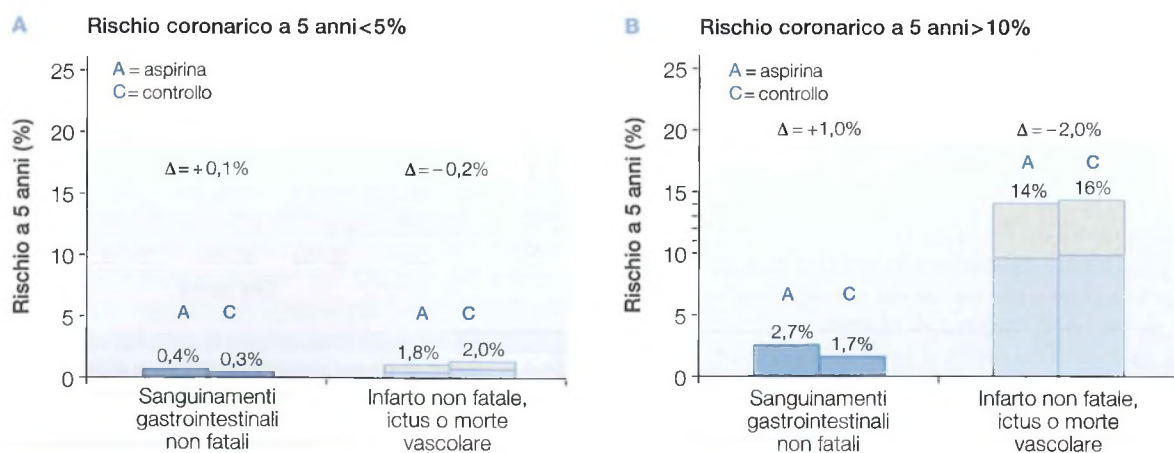


FIGURA 4.3 Effetti di un trattamento con aspirina stimati dai dati individuali dei trial di prevenzione primaria in due diverse categorie di rischio coronarico a 5 anni. Tre diversi outcome sono stati analizzati nel gruppo trattato con aspirina (A) e nel gruppo di controllo (C): sanguinamenti gastrointestinali (o altri non cerebrali) non fatali (colonne blu); eventi vascolari non fatali (colonne grigie); e mortalità vascolare (compresi i sanguinamenti fatali) (colonne azzurre). **A.** Effetti dell'aspirina in soggetti con rischio coronarico stimato a 5 anni inferiore al 5%. **B.** Effetti dell'aspirina in soggetti con rischio coronarico stimato a 5 anni superiore al 10%. (Da: ATT Collaboration. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 2009;373:1849-60, modificata)

Migliorare la personalizzazione dei trattamenti

Iniziativa altrettanto importante è quella del *National Institutes of Health* (NIH) e della FDA in USA per aiutare l'industria farmaceutica a integrare la farmacogenetica nel processo di sviluppo clinico. Il successo della "medicina personalizzata" dipende dall'aver test diagnostici accurati in grado di identificare i pazienti che possono trarre beneficio da terapie mirate. A tutt'oggi, circa il 10% dei foglietti illustrativi di farmaci approvati contengono informazioni di carattere farmacogenetico. Un esempio è rappresentato dallo sviluppo di test diagnostici per determinare quali tumori della mammella

sovra-esprimono *Human Epidermal growth factor Receptor type 2* (HER 2), che si associa con una prognosi peggiore ma ha valore predittivo nei confronti di una migliore risposta al trastuzumab. Attraverso i progressi in questo campo, è realistico attendersi di vedere trial clinici più efficienti in quanto basati su una comprensione più approfondita delle basi genetiche della malattia. È anche possibile ipotizzare che alcuni farmaci precedentemente scartati durante lo sviluppo clinico o ritirati dal commercio si dimostrino efficaci e sicuri in sottogruppi di pazienti con specifici biomarker genetici (Hamburg e Collins, NEJM, 2010). Indubbiamente, il futuro è appena cominciato!

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Il percorso di sviluppo clinico di un nuovo farmaco è contrassegnato da quattro fasi di variabile durata, ampiezza, tipo di end-point primario e probabilità di successo.
- ▶ Il trial clinico randomizzato e controllato di fase 3 fornisce i dati di efficacia e sicurezza, la cui valutazione da parte delle autorità regolatorie può portare alla commercializzazione del nuovo farmaco o all'approvazione di una nuova indicazione per un farmaco già prescrivibile.
- ▶ L'accertamento della sicurezza di un nuovo trattamento farmacologico può essere fatto soltanto in maniera preliminare negli studi di fase 3 e deve continuare dopo la eventuale approvazione del nuovo farmaco nella fase 4, soprattutto attraverso gli strumenti della farmacovigilanza e degli studi osservazionali.

Bibliografia essenziale

- ▶ ATT Collaboration. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 2009;373:1849-60.
- ▶ Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M et al.; ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007;357:2109-22.
- ▶ Bombardier C, Laine L, Reicin A et al.; VIGOR Study Group. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:1520-8.
- ▶ Bousser MG, Amarenco P, Fisher M et al. Terutroban versus aspirin in patients with cerebral ischaemic events (PERFORM): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet* 2011;377:2013-22.
- ▶ Bresalier RS, Sandler RS, Quan H et al. Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx (APPROVe) Trial Investigators. Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 2005;352:1092-102.
- ▶ Chabner BA. Early accelerated approval for highly targeted cancer drugs. *N Engl J Med* 2011;364:1087-9.
- ▶ D'Agostino RB. Changing end points in breast-cancer drug approval—the Avastin story. *NEJM* 2011;10.1056/NEJM p 1106984.
- ▶ Hamburg MA, Collins F. The path to personalized medicine. *N Engl J Med* 2010;363:301-4.
- ▶ ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988;2:349-60.
- ▶ Kearney PM, Baigent C, Godwin J et al. Do selective cyclooxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomized trials. *BMJ* 2006;332:1302-8.
- ▶ Patrono C, Garcia Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005;353:2373-83.

Recettori e trasduzione del segnale

CAPITOLO 5

Aspetti quantitativi e qualitativi dell'interazione farmaco-recettore

G. Enrico Rovati, Valérie Capra

CAPITOLO 6

Recettori e modulazione delle risposte recettoriali

Francesco Clementi, Guido Fumagalli

CAPITOLO 7

Adattamento della risposta alle sostanze e tossicodipendenza

Cristiano Chiamulera

CAPITOLO 8

Farmacologia delle modificazioni post-traduzionali

Monica Diluca, Flavia Valtorta, Fabrizio Gardoni

CAPITOLO 9

Regolazione dell'omeostasi del calcio intracellulare

Jacopo Meldolesi, Guido Fumagalli

CAPITOLO 10

Farmacologia delle MAP kinasi

Lucia Vicentini, Maria Grazia Cattaneo

CAPITOLO 11

Aspetti integrati della trasduzione intracellulare dei segnali recettoriali

Jacopo Meldolesi

2

Aspetti quantitativi e qualitativi dell'interazione farmaco-recettore

CAPITOLO

5

G. Enrico Rovati, Valérie Capra

Obiettivi formativi

- Acquisire le basi teoriche e pratiche per comprendere i meccanismi molecolari dell'azione dei farmaci (farmacodinamica)
- Acquisire nozioni di base sui parametri quantitativi (affinità, capacità, potenza, efficacia, attività intrinseca) e sugli aspetti qualitativi (cooperatività, ortosterismo e allosterismo) che regolano l'interazione farmaco-recettore
- Acquisire i concetti base di curve dose-risposta, fino ad arrivare alle definizioni farmacodinamiche delle varie classi di farmaci, seguendo l'evoluzione delle teorie dell'interazione farmaco-recettore dalla nascita ai giorni nostri

Con il termine “farmaco” (dal greco *farmakon*, principio attivo) si intende qualunque molecola dotata di attività biologica: quindi, non soltanto sostanze dotate di proprietà terapeutiche (farmaci in senso stretto), ma anche sostanze endogene, quali ormoni, neuroormoni, neurotrasmettitori, autacoidi e sostanze, per lo più esogene, di interesse prevalentemente tossicologico. Per generare il loro effetto biologico, la maggior parte dei farmaci (non tutti: vedi oltre) deve interagire con macromolecole specifiche, per lo più di natura proteica, presenti sulla superficie o all'interno della cellula, definite con il termine generico di “recettori” e dotate di funzione propria. Un farmaco quindi non crea un effetto, ma modula una funzione preesistente alterando lo stato funzionale del suo recettore.

Generalità e proprietà del recettore

I recettori per i farmaci sono molecole rilevanti per le funzioni cellulari

Il termine “recettore” è classicamente riservato alle macromolecole cellulari (proteine) deputate al riconoscimento di sostanze chimiche endogene (neurotrasmettitori, ormoni, fattori di crescita, autacoidi ecc.) e alla generazione di risposte biologiche. Talvolta il termine è usato anche per indicare il bersaglio molecolare dei farmaci, cioè la macromolecola a cui il farmaco si lega e di cui modifica la funzione. Ad esempio, il bersaglio molecolare della D-tubocurarina (un farmaco che provoca paralisi muscolare) è il recettore per il neurotrasmettitore acetilcolina; invece

il bersaglio molecolare della digossina (un glicoside cardioattivo usato in molte patologie cardiache) è un enzima che trasporta ioni attraverso la membrana cellulare, la pompa Na^+/K^+ -ATPasi.

Fra i farmaci il cui sito d'azione è un enzima, il più utilizzato è probabilmente l'aspirina, che deve la sua azione antinfiammatoria e analgesica alla sua capacità di acetilare, e quindi inibire, la ciclo ossigenasi, enzima responsabile della formazione delle prostaglandine (vedi Capitolo 44). Tra i farmaci i cui bersagli sono canali ionici sono i calcio-antagonisti (usati per lo più nella terapia cardiovascolare) e gli anestetici locali. Molti antibiotici e antimitotici hanno come “recettore” uno degli acidi nucleici, RNA o DNA, mentre la colchicina, farmaco usato nella terapia della gotta, è in grado di interferire con il processo di polimerizzazione della tubulina, molecola fondamentale del citoscheletro. È da tenere presente che farmaci anche di categoria diversa possono interagire con recettori situati su una medesima macromolecola o complesso macromolecolare: è questo il caso del neurotrasmettitore GABA, delle benzodiazepine (ansiolitici) e dei barbiturici (ipnotico-sedativi). Tutti e tre i farmaci (endogeno il GABA, esogeni gli altri) interagiscono con lo stesso complesso eteromero, chiamato recettore GABA_A e presente in numerose cellule del sistema nervoso centrale (vedi Capitolo 37): tuttavia ciascuno di essi riconosce e si lega a un suo “sito di legame” distinto, presente nel complesso macromolecolare che forma il recettore GABA_A . Non sempre sono note l'identità o la funzione del recettore di un farmaco. In alcuni casi, l'identificazione di

recettori per sostanze esogene ha preceduto la scoperta del ligando naturale "endogeno". È questo il caso dei recettori per gli oppioidi: il riconoscimento dell'esistenza di recettori specifici per la morfina, un agente esogeno, avvenne all'inizio degli anni 70 e stimolò la ricerca di sostanze endogene che si legassero normalmente a tale recettore. Da questa ricerca è poi scaturita l'importante scoperta di encefaline ed endorfine (vedi Capitolo 42).

■ Non tutti i farmaci interagiscono con un recettore

È importante ricordare che non tutti i farmaci richiedono un recettore per esplicare la loro azione: è chiaro, ad esempio, che le proprietà disinfettanti dell'acqua ossigenata sono dovute alle sue generali caratteristiche ossidanti; analogamente, l'uso del bicarbonato contro l'acidità gastrica non riflette l'esistenza di un recettore, ma semplicemente le sue caratteristiche acido-base; ancora, esistono farmaci che devono le loro azioni a proprietà osmotiche (certi lassativi) o surfattanti (disinfettanti). In generale, si può affermare che i farmaci che non esplicano il loro effetto attraverso un recettore agiscono a concentrazioni nettamente più alte di quelli la cui azione è invece mediata da un recettore specifico. Inoltre, molti farmaci possono anche legarsi, oltre che a recettori specifici, anche a componenti tessutali e a proteine plasmatiche senza indurre effetti biologici; in questo caso i siti di legame possono avere funzione di deposito o di trasporto del farmaco.

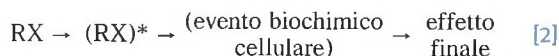
■ Per molti farmaci, l'attività biologica è dovuta alla formazione di un complesso con i loro recettori

Nella restante parte di questo capitolo, si prenderà in considerazione l'interazione di agenti con i loro recettori secondo la modalità che presuppone un'interazione reversibile e stechiometrica tra farmaco e recettore secondo la legge di azione delle masse (modello matematico che spiega e predice il comportamento di molecole libere in soluzione in equilibrio dinamico tra loro). Questa è la modalità più diffusa per le sostanze endogene (ormoni, neurotrasmettitori ecc.). Non verranno quindi considerate le interazioni che presuppongono una modificazione covalente del bersaglio da parte del farmaco (come avviene, ad esempio, nel caso dell'aspirina).

Si può pertanto schematizzare l'interazione farmaco-recettore nel modo seguente:



dove R rappresenta il recettore, X il farmaco (cioè, il "ligando" per un determinato recettore) e RX il complesso farmaco-recettore. La reazione avviene generalmente in condizioni di eccesso di farmaco. L'interazione scatena poi la serie di eventi che porteranno alla risposta finale e che si può schematizzare come segue:



Secondo questa ipotesi, che chiameremo "classica", il complesso RX – che può eventualmente essere soggetto a un cambiamento conformazionale, qui rappresentato

da (RX)* – è l'unica entità in grado di iniziare la serie di eventi che porta all'effetto finale, mentre R o X, di per sé, sono inattivi. La produzione di una risposta biologica finale comporta anche, nel caso di molti ma non di tutti i recettori, la formazione intermedia di un secondo messaggero o le variazioni di concentrazione di uno ione.

■ L'interazione tra farmaco e recettore è generalmente mediata da legami chimici deboli

I legami chimici che si possono formare in un mezzo acquoso tra sostanze chimiche che giungono in contatto tra loro possono essere ad alta e bassa energia. Gli ultimi sono i più comuni e si suddividono in: a) legami ionici che si formano fra atomi con carica opposta; b) ponti idrogeno in cui un atomo di idrogeno legato a un atomo elettronegativo, ad esempio ossigeno o azoto, si lega a un altro atomo elettronegativo; c) attrazioni di van der Waals che si generano fra due atomi qualsiasi, che si trovino a distanza molto ravvicinata, a opera delle loro cariche elettriche fluttuanti; d) interazioni idrofobiche causate dalle molecole di acqua che, per minimizzare l'effetto dei gruppi idrofobici sui legami di idrogeno dell'acqua stessa, costringono tali gruppi idrofobici a raggrupparsi fra di loro. Tutte queste forze di legame hanno in comune la caratteristica di richiedere un'energia 20-200 volte inferiore rispetto a quella necessaria per rompere i legami covalenti (ad alta energia) che tengono insieme gli atomi di una stessa molecola, e di essere appena più forti dell'energia media di una collisione termica a temperature fisiologiche. Affinché il contatto tra un farmaco e il suo recettore persista per un tempo significativo e sufficiente a generare l'effetto biologico, occorre che il numero di legami a bassa energia sia relativamente elevato. Inoltre, poiché i legami chimici deboli si formano solo se gli atomi coinvolti giungono in stretta vicinanza tra loro, è necessario che la superficie della molecola di farmaco e quella della molecola di recettore siano chimicamente complementari l'una all'altra (Figura 5.1). Questa complementarietà farmaco-recettore è alla base della selettività dell'interazione farmacologica (Box 1).

È importante tuttavia ricordare che il farmaco può riconoscere superfici molecolari complementari presenti su macromolecole diverse dal suo "recettore" principale. Ad esempio, i farmaci β -2 agonisti (broncodilatatori) sono in grado di attivare in modo specifico i recettori adrenergici di tipo β -2 presenti nella muscolatura bronchiale, ma a concentrazioni più alte sono anche in grado di produrre un'importante attivazione dei recettori adrenergici di tipo β -1 presenti nel tessuto cardiaco. Il modello che meglio spiega questo fenomeno prevede che i farmaci in questione abbiano un sito di legame altamente complementare (e quindi si leghino saldamente) sul recettore β -2. Sul recettore β -1 tale sito è solo parzialmente complementare e il legame è più labile; l'attivazione del recettore può però diventare significativa se si aumenta la probabilità di interazione tra farmaco e recettore, cioè se si aumenta la concentrazione del farmaco, allungando quindi il tempo di occupazione dei siti di legame disponibili nel campione in esame. Quindi, la selettività di un farmaco

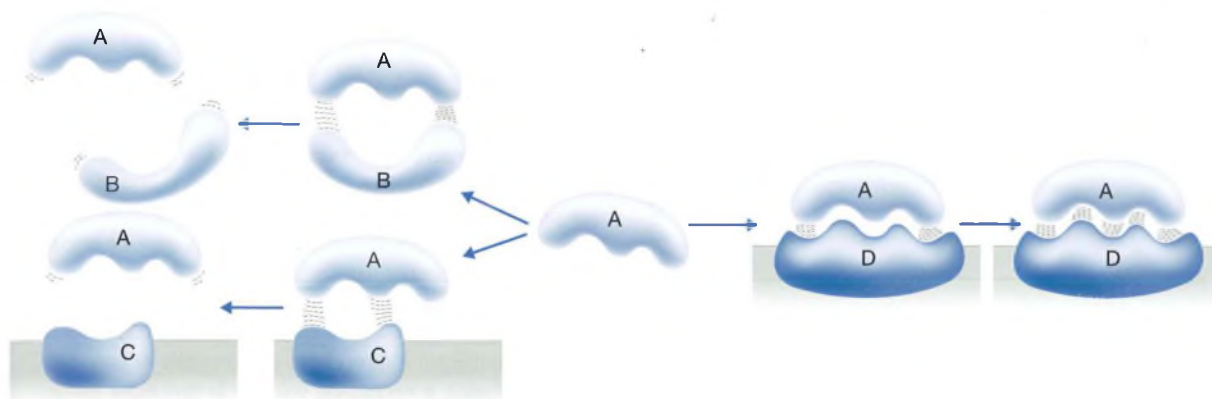


FIGURA 5.1 La formazione di legami deboli è responsabile del processo di riconoscimento tra farmaco e recettore. La molecola A, a causa del moto termico, incontra casualmente altre molecole (in questo esempio B è una molecola solubile, C e D sono proteine intrinseche di membrana). Mentre con B e C si possono formare soltanto pochi legami deboli, che si scindono rapidamente, le superfici di A e D sono complementari fra loro nelle zone di contatto e si formano numerosi legami; in questo caso l'interazione è più duratura.

nei confronti di sottotipi dello stesso recettore è anche funzione della sua concentrazione.

Le interazioni farmaco-recettore possono essere reversibili o irreversibili

Il fatto che farmaco e recettore siano tenuti uniti tra loro da forze chimiche deboli implica che nella maggior parte dei casi l'interazione è limitata nel tempo: una molecola di farmaco si stacca dal suo recettore, diffonde ed eventualmente si lega a un'altra molecola recettoriale, mentre il sito sulla prima macromolecola rimane vacante finché è occupato da un'altra molecola di farmaco. L'interazione farmaco-recettore è in questo caso *reversibile* (vedi [1]). Quando il numero di legami chimici deboli è estremamente elevato, come nel caso dell'interazione tra una tossina paralizzante di cobra, alfa-bungarotossina, e il recettore nicotinico per l'acetilcolina, l'energia presente nel sistema biologico può essere insufficiente a causare il distacco del farmaco dal suo recettore: in questo caso l'interazione è *irreversibile*. Spesso le interazioni irreversibili (o insormontabili, vedi oltre) sono causate dalla formazione di legami covalenti tra farmaco e recettore, come nel caso di aloalchilamine e recettori alfa-adrenergici. Si ricorda che la trattazione matematica dell'interazione farmaco-recettore esposta in questo capitolo si riferisce a interazioni reversibili.

Per quanto riguarda le metodologie per lo studio del legame farmaco-recettore, vedi CD: Approfondimento 5.1. *Metodiche di studio dei recettori.*

Caratteristiche dell'interazione farmaco-recettore

I principali parametri che caratterizzano l'interazione di un farmaco con i suoi siti di legame specifici sono generalmente determinati attraverso gli studi di *binding* (legame); tali parametri sono: la costante di dissociazione; la densità dei siti; le costanti cinetiche.

Come indicato dalla [1], la formazione del complesso RX è una reazione reversibile e, come tale, possiede una costante di equilibrio:

$$K_a = \frac{[RX]}{[R][X]} \quad [3]$$

dove [RX] è la concentrazione del complesso farmaco-recettore all'equilibrio, e [R] e [X] rappresentano rispettivamente le concentrazioni di recettore e farmaco liberi all'equilibrio. K_a , definita *costante di associazione* o di *affinità*, indica quanto la reazione è spostata verso la formazione del complesso ed è pertanto correlata alla forza del legame chimico tra farmaco e recettore (quindi fondamentalmente al numero di legami chimici deboli che si instaurano fra essi).

Per tradizione, però, come indice dell'affinità di un farmaco per il suo recettore è più frequentemente usata la costante di equilibrio della reazione inversa, cioè della reazione di dissociazione del complesso $RX \rightarrow R + X$, in quanto ha le dimensioni di una concentrazione (ad esempio, mol/l):

$$K_d = \frac{[R][X]}{[RX]} = \frac{1}{K_a} \quad [4]$$

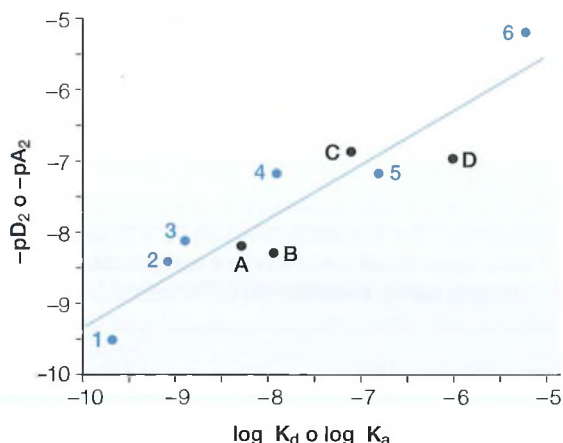
K_d , denominata *costante di dissociazione*, è pertanto inversamente correlata all'affinità del ligando per il recettore.

Per densità dei siti, generalmente indicata con B_{\max} o R_T , si intende il numero massimo di siti di legame presenti per cellula. Il numero di siti coincide con il numero massimo di molecole di ligando solo se ogni recettore è legato da un'unica molecola di ligando, cioè se ogni recettore possiede un unico sito di legame. La densità dei siti può essere espressa anche per unità di peso in proteine cellulari, se lo studio è condotto su una frazione subcellulare invece che su cellule intatte, o per unità di peso di tessuto, oppure semplicemente in mol/l.

È importante ricordare che i parametri elencati finora si riferiscono a situazioni di equilibrio, in cui il numero

BOX 1 Criteri di identificazione di un recettore

Gli studi di binding permettono l'identificazione di siti di legame selettivi e saturabili per un determinato ligando oltre alla determinazione della sua affinità per il recettore. Tuttavia, affinità, selettività e saturabilità (i recettori sono pochi e la reazione avviene in eccesso di farmaco, al contrario del binding non specifico; vedi CD: Approfondimento 5.2. *Esecuzione di studi di binding*) sono condizioni necessarie, ma non sufficienti,



Correlazione fra attività biologica e legame al recettore per una serie di agonisti e antagonisti. In questo esempio è correlata la broncocostrizione indotta da vari leucotrieni (punti A-D) o l'inibizione della stessa indotta da una serie di antagonisti (punti 1-6) con l'affinità ricavata da esperimenti di binding (saturazione o competizione) al recettore di $^3\text{H-LTD}_4$. La correlazione è altamente significativa ($r^2 = 0,85$, $p < 0,001$).

per poter concludere che il sito identificato è realmente un recettore; è infatti possibile che il ligando interagisca anche con altre molecole cellulari (accettori) saturabili e dotate di requisiti strutturali stringenti, come ad esempio enzimi, canali ionici, trasportatori e altre. Per poter concludere che il sito di legame identificato è il recettore responsabile di una data attività biologica, è necessario valutare la specificità farmacologica del sito di legame (qualunque agonista che agisce su un particolare tipo di recettore fornisce sempre le stesse risposte cellulari nella stessa cellula), il suo profilo farmacologico (possono cambiare i valori assoluti delle affinità, ma non l'ordine di potenza dei vari agonisti o antagonisti) e infine la correlazione tra attività biologica e legame recettoriale.

In altre parole, dagli studi di binding bisognerà ricavare le K_d di una serie di agonisti e/o antagonisti, mentre dall'analisi delle curve dose-risposta si ricaveranno i valori di pD_2 (agonisti) o pA_2 (antagonisti) per gli stessi composti, cioè le loro potenze. Si valuterà poi se esiste una correlazione fra queste due serie di valori, come mostrato nella figura 1. È chiaro, quindi, che potenza e affinità, benché entrambe correlate alla concentrazione/dose del farmaco e quindi due facce della stessa medaglia, sono due parametri quantitativi dell'interazione farmaco-recettore ben distinti e non vanno mai utilizzati come sinonimi.

di molecole di complesso RX che si forma nell'unità di tempo è uguale al numero di molecole di complesso che si dissocia.

Le costanti cinetiche sono le costanti di velocità della reazione diretta (formazione del complesso), K_{on} , e inversa (scissione del complesso), K_{off} , per cui vale la relazione:

$$\frac{K_{off}}{K_{on}} = K_d \quad [5]$$

Le costanti cinetiche regolano i tempi dell'interazione farmaco-recettore; infatti, K_{on} è un indice del tempo necessario per raggiungere l'equilibrio nella reazione di legame del farmaco al recettore, mentre K_{off} è correlata alla permanenza del complesso stesso. K_{on} dipende in parte dalla facilità di accesso del farmaco al suo sito di legame, che può trovarsi, ad esempio, in una tasca interna della macromolecola recettoriale. Sostituzioni chimiche che conferiscano una particolare flessibilità alla molecola di farmaco possono quindi comportare importanti variazioni di K_{on} . K_{off} dipende in gran parte dal numero di legami chimici deboli che si stabiliscono fra farmaco e recettore; maggiore è la complementarità chimico-fisica tra farmaco e recettore, più lenta è la loro dissociazione. La dissociazione del complesso farmaco-recettore, in assenza di formazione di nuove molecole di complesso RX, porta alla cessazione del segnale all'origine della risposta biologica al farmaco.

La relazione fra concentrazione di farmaco e complesso farmaco-recettore è simile all'equazione di Michaelis-Menten

L'interazione tra R e X presenta notevoli analogie sostanziali e formali con l'interazione enzima-substrato. A partire dalla definizione di K_d (vedi la [4]) e definendo $[R_T]$ la concentrazione totale dei recettori, ne consegue che:

$$[R_T] = [R] + [RX]; \quad [6]$$

ricavando $[R]$ dalla [4]:

$$[R] = \frac{K_d [RX]}{[X]} \quad [7]$$

e sostituendolo nella [6] si ottiene:

$$[R_T] = [RX] + \frac{K_d [RX]}{[X]} \quad [8]$$

Riarrangiando la [8], si ottiene l'equazione fondamentale che correla la concentrazione di farmaco alla concentrazione del complesso RX:

$$[RX] = \frac{[X] [R_T]}{K_d + [X]} \quad \text{o} \quad B = \frac{[X] B_{max}}{K_d + [X]} \quad [9]$$

dove B (*bound*, "legato") indica la concentrazione di farmaco legato al recettore, equivalente a $[RX]$, e B_{max} è equivalente a $[R_T]$.

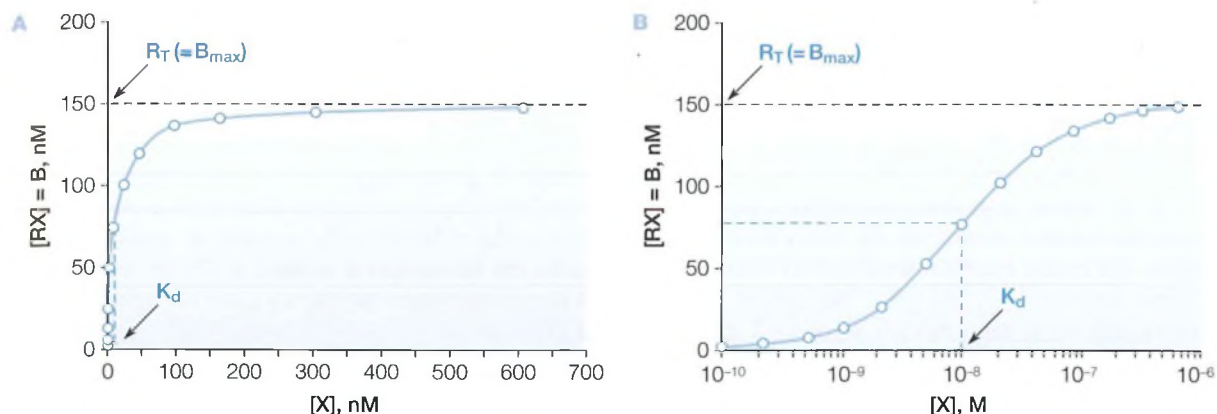


FIGURA 5.2 Isotherma di legame: concentrazione del complesso farmaco-recettore (RX o B) in funzione della concentrazione del farmaco libero (X). In questo esempio, $K_d = 10$ nM e $R_T = B_{max} = 150$ nM. B_{max} si ottiene dal valore del plateau a cui la curva tende asintoticamente; K_d è pari alla concentrazione di farmaco che provoca la saturazione del 50% dei recettori presenti. **A.** Grafico in scala aritmetica. **B.** Gli stessi dati di A in scala semilogaritmica.

La [9], che è formalmente uguale all'equazione di Michaelis-Menten, prende il nome di *isoterma di legame* o *isoterma di Langmuir*, ed è rappresentata nella figura 5.2A (iperbole rettangolare). La figura 5.2B rappresenta la stessa equazione in grafico semilogaritmico (sigmoide).

Lisoterma di legame e le sue trasformazioni lineari permettono di ricavare i parametri dell'interazione farmaco-recettore

Grazie all'esecuzione di un esperimento di binding all'equilibrio con concentrazioni crescenti di ligando, si possono costruire curve come quelle mostrate nella figura 5.2, dal cui esame derivano immediatamente i parametri dell'interazione farmaco-recettore. Infatti, come indicato anche in figura 5.2, R_T corrisponde al valore dell'asintoto a cui la curva tende (plateau superiore della curva), mentre K_d , è numericamente identica alla concentrazione del farmaco [X] necessaria per saturare il 50% di tutti i siti presenti, cioè K_d è pari alla concentrazione di farmaco libero [X] quando le quantità di recettore legato [RX] e non legato [R] sono, all'equilibrio, uguali.

A queste conclusioni si arriva anche a partire dalla [9]; infatti, per $X \rightarrow \infty$, si ricava facilmente che $RX \rightarrow R_T$ (oppure $B \rightarrow B_{max}$). Per RX pari a metà di R_T , si ottiene $X = K_d$. L'equazione fondamentale che regola l'interazione farmaco-recettore può essere trasformata linearmente in vari modi per ottenere grafici rettilinei, che rendono più facile l'interpolazione di dati sperimentali. La più usata di tali trasformazioni lineari è sicuramente quella secondo Scatchard:

$$\frac{RX}{[X]} = \frac{1}{K_d} \cdot [RX] + \frac{[R_T]}{K_d} \quad [10a]$$

oppure

$$\frac{B}{F} = \frac{1}{K_d} \cdot B + \frac{B_{max}}{K_d} \quad [10b]$$

dove F (*free*, "libero") è equivalente a [X].

Il grafico relativo alla [10] è rappresentato nella figura 5.3, dove è anche mostrato come è possibile ricavare

K_d ed R_T . Nonostante la rappresentazione grafica secondo Scatchard sia ancora utilizzata, l'analisi dei dati di binding secondo la linearizzazione di Scatchard non è più considerata accettabile per l'elevato errore associato alla determinazione dei parametri in presenza di errore sperimentale o di recettori eterogenei. Attualmente, il calcolo dei parametri prevede l'utilizzo di programmi al calcolatore basati sull'isoterma di Langmuir (vedi [9]).

I recettori possono essere eterogenei

Quanto detto finora è valido nel caso in cui il ligando in esame interagisca con una classe omogenea di recettori (un solo tipo di recettore presente). Molto spesso si verifica il caso in cui sono in realtà presenti più sottotipi recettoriali e il farmaco in esame potrebbe non essere dotato di sufficiente selettività per discriminare tra le sottopopolazioni recettoriali. Numerosi esempi di sottotipi recettoriali verranno discussi nella sezione 3.

In presenza di sottotipi recettoriali multipli che differiscano fra loro per affinità e/o per numero, le curve di

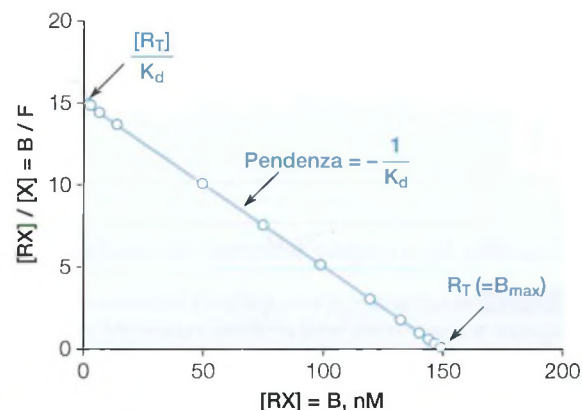


FIGURA 5.3 Grafico di Scatchard: trasformazione lineare dei dati della figura 5.2. B_{max} si ottiene dall'intercetta sull'asse delle ascisse, e K_d si ricava dal valore della pendenza della retta.

interazione farmaco-recettore mostrate nelle figure 5.2A, 5.2B e 5.3 risultano modificate come mostrato nella figura 5.4. Se le differenze fra le figure 5.2A e 5.4A possono sfuggire a un esame superficiale, il confronto fra le figure 5.2B e 5.4C indica che, mentre in presenza di un solo tipo di recettori la curva si estende sull'asse delle ascisse per circa 2 ordini di grandezza, quando siano presenti due o più sottotipi recettoriali tale curva diviene meno ripida e più estesa, eventualmente con un visibile punto di flesso intermedio (Figura 5.4D). Nel caso in cui i dati sperimentali siano rappresentati secondo il grafico di Scatchard (Figura 5.4B), la differenza risulta molto netta: il grafico, rettilineo in presenza di un solo recettore, diventa curvilineo in presenza di eterogeneità dei siti di legame.

Farmaci diversi possono competere per il legame a uno stesso recettore

Il concetto di affinità è estremamente utile soprattutto quando si voglia paragonare la "capacità" di due farmaci diversi nel legare lo stesso recettore. Un farmaco A con

K_d pari a 1 mM (10^{-6} μ M), ha un'affinità inferiore per il recettore rispetto a un farmaco B con K_d per lo stesso recettore di 1 nM (10^{-9} M): questi valori indicano infatti che per legare il 50% dei recettori con il farmaco A occorre una concentrazione mille volte superiore rispetto al farmaco B. In termini molecolari, questo significa che la probabilità che un complesso RX si formi in sostituzione di uno che si scinde sono, a parità di concentrazione, molto più elevate per il farmaco B. Poiché le differenze di K_d possono essere dovute a K_{on} e/o K_{off} differenti (vedi la [5]), esse sono dovute, in ultima analisi, a differenze nella struttura chimico-fisica dei farmaci.

Quando due molecole di farmaci diversi si presentano sullo stesso sito di un'unica molecola recettoriale, solo uno dei due farmaci può legarsi. Se il legame è reversibile, si instaurerà una *competizione* tra i due farmaci per occupare il recettore, sempre basata sulla legge d'azione delle masse. Nel tempo, il farmaco che ha occupato più a lungo la popolazione di recettori presenti sarà quello che si lega più rapidamente e/o si distacca più

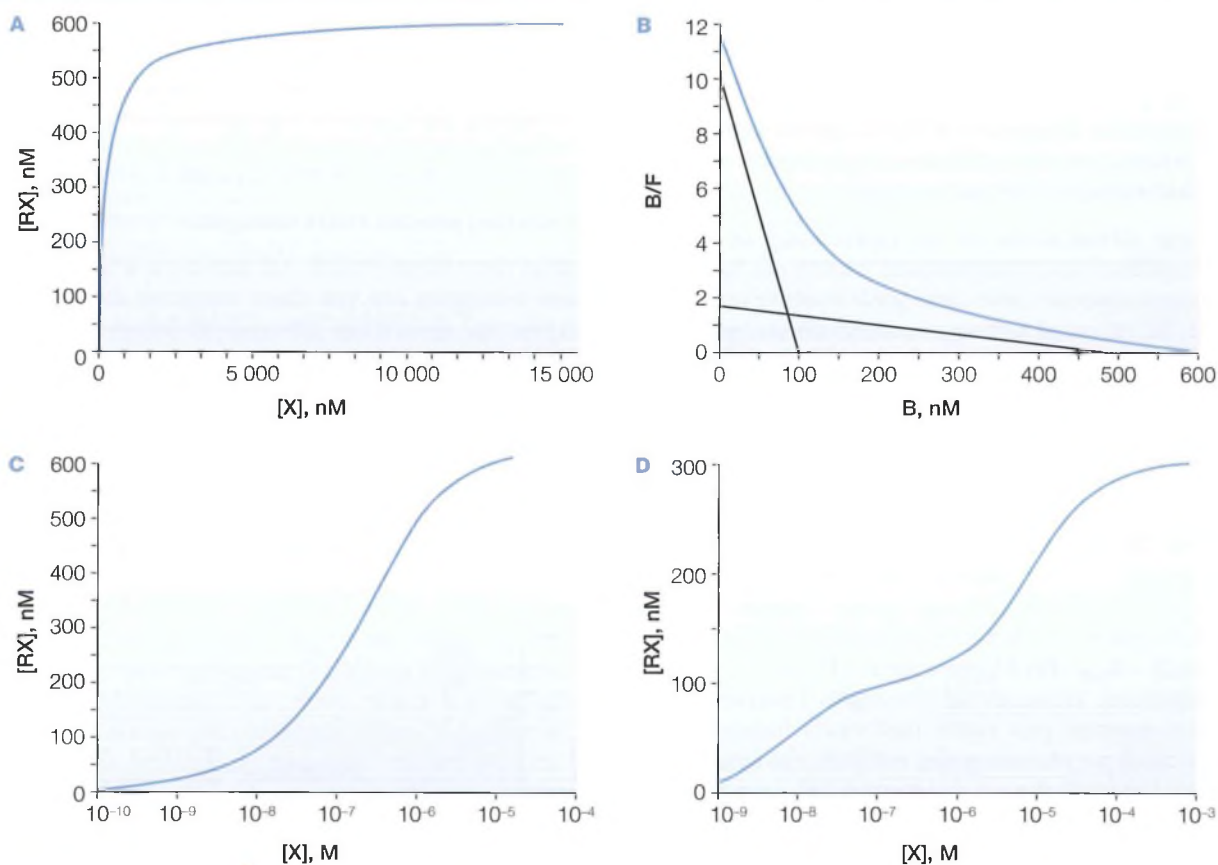


FIGURA 5.4 Isotherma di legame e grafico di Scatchard nel caso di interazione di un farmaco con due classi di recettori. Un esempio di questo tipo si può ottenere eseguendo un esperimento di binding con un farmaco abbastanza selettivo per i recettori β_1 (ad esempio, atenololo) in un tessuto, come la corteccia cerebrale di ratto, che possessa sia recettori β_1 sia recettori β_2 . **A.** Grafico in scala aritmetica; **B.** grafico di Scatchard e **C.** grafico semilogaritmico, relativi a un farmaco abbastanza selettivo nei confronti dei due sottotipi recettoriali. I parametri sono i seguenti: K_d per il recettore 1 = 10 nM; K_d per il recettore 2 = 300 nM; B_{max} del recettore 1 = 100 nM; B_{max} del recettore 2 = 500 nM. Si noti come solo con il grafico di Scatchard si possa apprezzare la presenza dei due siti di legame per il farmaco aventi affinità diversa: infatti nel grafico B i dati sperimentali disegnano una curva che è scomponibile nelle due rette colorate da cui è possibile ricavare i valori di K_d dei due siti di legame. Se nel tessuto esistono siti di legame con K_d enormemente diverse ($K_{d1} = 10$ nM, $K_{d2} = 10.000$ nM), la loro presenza può essere già notata in un grafico semilogaritmico (**D**) per la comparsa di un flesso nella curva.

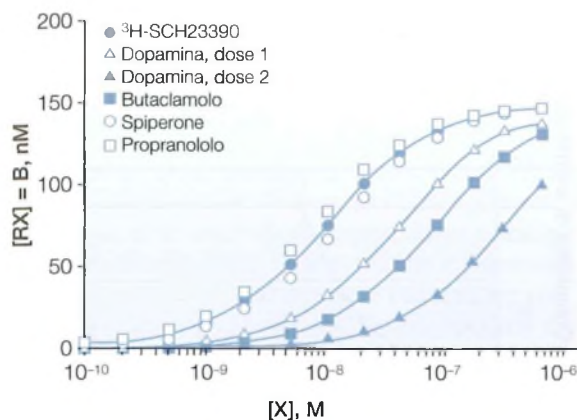


FIGURA 5.5 Isoterme di legame di un farmaco radioattivo (ad esempio: $^3\text{H-SCH23390}$, ligando dei recettori dopaminergici D_1 e D_5) da solo (pallini pieni) o in presenza di dosi crescenti di un altro farmaco che si leghi agli stessi recettori (ad esempio: dopamina a due diverse dosi, triangoli pieni e triangoli vuoti). Per ciascuna curva si può ottenere un valore apparente di K_d (concentrazione che satura il 50% dei siti presenti) diverso, che aumenta all'aumentare della concentrazione del farmaco competitore. Analogo spostamento della curva di legame verso destra si ottiene anche in presenza di farmaci diversi (ad esempio: butaclamololo, quadrati pieni, un antagonista che si lega a molte sottoclassi del recettore della dopamina). Al contrario, spiperone (pallini vuoti), un ligando del recettore dopaminergico D_2 , e propranololo (quadrati vuoti), un ligando dei recettori β -adrenergici, non modificano significativamente la curva di legame di $^3\text{H-SCH23390}$.

lentamente: quindi il farmaco con maggiore affinità. Se a contrastare il legame del farmaco affine mettiamo una grossa quantità del farmaco poco affine, si otterrà il risultato di aumentare le probabilità dell'incontro tra il recettore e il farmaco poco affine e, di conseguenza, di ridurre la proporzione di tempo in cui il farmaco più affine è legato. Ovviamente si può riportare questo valore a quello misurato all'inizio, aumentando anche il numero di molecole di farmaco più affine. Perché tra due farmaci esista competizione, occorre che il loro legame con il recettore sia reversibile; in caso contrario, una volta occupato il recettore non è più disponibile per un secondo ligando. La competizione determina uno spostamento delle curve di legame e quindi una riduzione apparente dell'affinità. Ciò è mostrato nella figura 5.5, che rappresenta la curva di legame di un ligando radioattivo in presenza e in assenza di ligandi non marcati che si legano allo stesso o ad altri recettori.

Aspetti quantitativi delle risposte ai farmaci: analisi delle curve dose-risposta

La relazione fra concentrazione (espressa in molarità o in peso del farmaco per volume di soluzione, ad esempio μM o mg/l) di un farmaco e il grado di risposta ottenuto prende il nome di *curva concentrazione-risposta*. Quando la sperimentazione è condotta in vivo, l'effetto è messo in relazione con la dose di farmaco somministrata, espressa in peso del farmaco per peso corporeo (ad esempio mg/kg), e la relativa curva è chiamata *curva dose-risposta*. Per brevità, la denominazione "curva dose-risposta" è usata anche nel caso di esperimenti in vitro.

Come già accennato, l'analisi delle curve dose-risposta in base alla teoria dell'interazione farmaco-recettore è uno dei modi per ottenere informazioni sull'interazione iniziale. Inoltre, l'analisi delle suddette curve evidenzia alcuni fenomeni fondamentali della farmacologia, quali l'esistenza di farmaci dotati di attività qualitativamente uguali ma quantitativamente diverse (in potenza o efficacia), o l'esistenza di agonisti, agonisti parziali, antagonisti e agonisti inversi.

Per quanto riguarda le risposte farmacologiche, esse possono essere classificate come:

- risposte graduali: sono risposte misurabili in continuo, ovvero la risposta può assumere qualsiasi valore, aumentando progressivamente all'aumentare della dose e tendendo asintoticamente a un valore massimo; esempi di risposte graduali sono la forza di contrazione di un muscolo, l'attivazione di un enzima, l'aumento di pressione sanguigna;
- risposte non misurabili in continuo, ma che si possono classificare e ordinare con un voto (score) o uno stadio (stage), ad esempio la formazione di ulcere, alcuni effetti comportamentali o i risultati di molti studi clinici (ad esempio, la valutazione del grado di dolore); in questi casi, la distanza fra i diversi stadi è priva di significato: un paziente con vasculopatia periferica al IV stadio secondo Fontaine non ha il doppio di dolore di un paziente al II stadio;
- risposte tutto-o-nulla (quantali): rappresentano un caso estremo del precedente, dove gli stadi possibili sono soltanto due; esempi di questi tipi di risposte sono la morte, la remissione completa di una malattia, il raggiungimento di un livello predefinito di risposta altrimenti continua.

Soprattutto nel caso di risposte tutto-o-nulla, poiché esistono soltanto due stadi possibili di risposta, la relazione fra dose (o concentrazione) e risposta è generalmente espressa indicando il numero di individui in una popolazione (frequenza) per cui si verifica quel determinato effetto. In questo caso, la curva dose-risposta può prendere la forma di un istogramma delle frequenze o di una curva cumulativa (Figura 5.6).

Definizione dei termini potenza ed efficacia

Quando l'entità degli effetti di un farmaco è messa in relazione grafica con la dose (o la concentrazione), si ottengono curve la cui forma e posizione sono funzione di molte variabili. Tuttavia, alcuni termini comuni devono essere chiariti. La posizione di una curva sull'asse delle ascisse riflette la *potenza* del farmaco: più una curva dose-risposta è situata a sinistra sull'asse delle ascisse, più potente è il farmaco a cui la curva si riferisce (Figura 5.7). La potenza di un farmaco

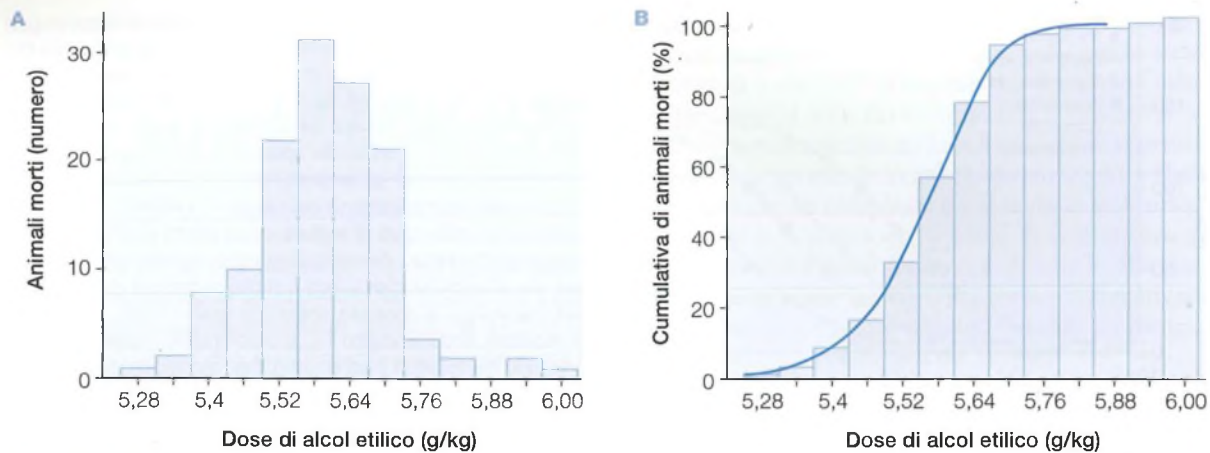


FIGURA 5.6 Curve dose-risposta in una popolazione: effetto letale di dosi crescenti di alcol etilico. Dosi crescenti di alcol etilico venivano somministrate a ciascun animale, e si registrava il numero di animali che morivano a ciascuna dose. **A.** Istogramma delle frequenze: solo pochi animali sopravvivevano fino a dosi di 5,7 g/kg. **B.** Curva cumulativa ottenuta dalla precedente calcolando per ciascuna dose la percentuale di animali che morivano rispetto al numero totale, e sommando tale percentuale alla percentuale relativa a tutte le dosi inferiori a quella considerata. La curva cumulativa mostra quindi la percentuale di soggetti in cui compare, al variare della dose, l'effetto misurato.

ha, di per sé, un interesse relativo nella pratica clinica: essa influenza esclusivamente la dose necessaria per ottenere un determinato effetto. Per convenzione si assume come valore di paragone della potenza quella concentrazione di farmaco che genera un effetto pari al 50% dell'effetto massimo: tale concentrazione è definita EC_{50} (*Effective Concentration 50*). Nel caso di somministrazioni in vivo, come già accennato, si utilizzerà l'equivalente di EC_{50} , cioè ED_{50} (o $D_{max/2}$) = *Effective Dose 50*, dose che produce il 50% dell'effetto massimo. Poiché è spesso scomodo esprimere ED_{50} o EC_{50} in mol/l, si è convenuto di esprimere la potenza dei farmaci con il parametro pD_2 , dove:

$$pD_2 = -\log ED_{50} \quad [11]$$

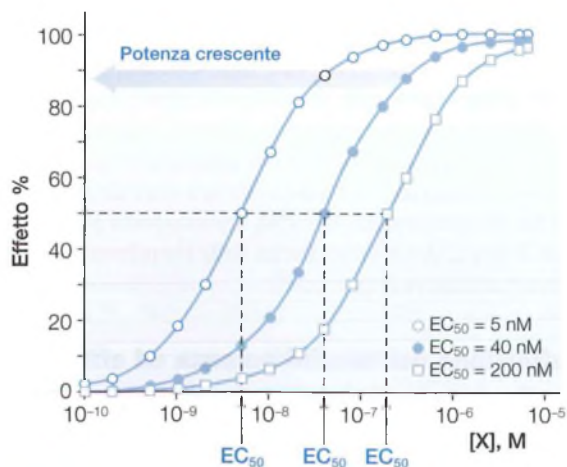


FIGURA 5.7 Curve dose-risposta in scala semilogaritmica. Curve di farmaci con potenza diversa; un esempio di questo tipo potrebbe essere costituito dal rilassamento della muscolatura bronchiale da parte di farmaci β_2 -adrenergici. $EC_{50} = 5$ nM (pallini vuoti), 40 nM (pallini pieni) e 200 nM (quadrati vuoti).

In clinica assume invece un interesse maggiore l'*efficacia* di un farmaco, cioè l'entità massima dell'effetto che esso può indurre. Nell'esempio mostrato nella figura 5.7, i tre farmaci differiscono per potenza ma hanno pari efficacia. Potenza ed efficacia sono quindi due termini che non devono essere assolutamente confusi tra loro. Un esempio classico e illuminante in tal senso è rappresentato dalle diverse classi di diuretici: mentre i diuretici tiazidici sono molto potenti (attivi a basse concentrazioni plasmatiche), i farmaci dotati dell'effetto diuretico massimo (perciò più efficaci) sono i diuretici dell'ansa (furosemide).

Relazioni fra interazione farmaco-recettore e risposta

Nel corso degli anni sono stati proposti vari modelli matematici e biochimici per spiegare le relazioni esistenti fra interazione farmaco-recettore e generazione della risposta farmacologica. Le teorie più importanti sono illustrate di seguito.

Teoria dell'occupazione

La teoria dell'occupazione (*occupancy assumption*), proposta da Clark nel 1933, ipotizza che l'effetto (Δ) di un farmaco sia proporzionale al grado di occupazione del recettore, e quindi alla concentrazione $[RX]$ del complesso farmaco-recettore:

$$\Delta = k [RX] \quad [12]$$

L'effetto massimo si otterrà quando tutti i recettori presenti siano occupati, e pertanto:

$$\Delta_{max} = k [R_T] \quad [13]$$

Dalle equazioni [4], [12] e [13] si ricava facilmente la relazione che lega l'effetto alla concentrazione del farmaco:

$$\Delta = \frac{[X] \cdot \Delta_{\max}}{EC_{50} + [X]} \quad [14]$$

Confrontando quest'ultima equazione con la [9], risulta evidente che sono formalmente identiche; pertanto, la forma delle curve dose-risposta, rappresentata nella figura 5.7, è identica alla forma delle curve che rappresentano la relazione fra la concentrazione e l'interazione con il recettore (Figura 5.2B), come è logico aspettarsi data l'ipotesi di partenza.

È importante ribadire che la [14] vale soltanto se:

- la reazione di interazione farmaco-recettore è reversibile;
- è stato raggiunto l'equilibrio;
- i recettori sono tutti omogenei;
- l'interazione è stechiometrica, cioè una molecola di farmaco si lega a una molecola di recettore (vedi la [1]);
- i recettori sono indipendenti l'uno dall'altro, cioè l'occupazione di uno di essi non influenza la capacità degli altri di essere occupati (assenza di cooperatività).

Nelle condizioni in cui è valida l'ipotesi dell'occupazione, la curva dose-risposta coincide esattamente con la curva di interazione farmaco-recettore costruita con esperimenti di binding.

Dalla [14] si ricava che per $[X] \rightarrow \infty$, $\Delta \rightarrow \Delta_{\max}$ (cioè, l'effetto tende asintoticamente all'effetto massimo al crescere della concentrazione di farmaco) e che la EC_{50} è numericamente identica alla K_d . Nell'ipotesi dell'occupazione, $EC_{50} = K_d$, cioè EC_{50} è una misura diretta dell'affinità del farmaco per il recettore.

La posizione di una curva sull'asse delle ascisse, che può essere individuata attraverso la EC_{50} , rispecchia la potenza di un farmaco, caratteristica che, in base a quanto appena discusso, è correlata alla sua affinità (Box 1).

■ Caratteristiche delle curve dose-risposta

La figura 5.7 mostra che le curve dose-risposta prendono la forma di una sigmoide simmetrica attorno al valore di EC_{50} in un grafico semi-logaritmico. Le curve dose-risposta di tipo semi-logaritmico godono di alcune proprietà che ne rendono l'utilizzo più conveniente delle curve aritmetiche:

- la parte centrale della curva sigmoide è approssimabile a una retta, e quindi permette di interpolare i dati sperimentali e di ricavare la EC_{50} più facilmente;
- farmaci che agiscono attraverso lo stesso recettore generano curve dose-risposta parallele;
- in quest'ultimo caso, la separazione costante fra le curve parallele è una misura del rapporto di potenza fra diversi farmaci;
- se il farmaco interagisce con un solo tipo di recettori, la curva dose-risposta si sviluppa all'incirca in due ordini di grandezza e, più precisamente, l'effetto varia dal 10 al 90% del massimo per variazioni di $[X]$ di 100 volte;
- una curva che si sviluppi in più di due ordini di grandezza indica generalmente l'interazione del farmaco con vari tipi di recettori; la pendenza del tratto

rettileo della curva dose-risposta è un indice della maneggevolezza clinica del farmaco: meno ripida è la curva, minori saranno le variazioni di intensità dell'efficacia della terapia dovute a variazioni della concentrazione plasmatica del farmaco nel paziente (vedi Capitolo 53).

■ L'ipotesi dell'occupazione non spiega tutti i fenomeni farmacologici

Già dalla metà degli anni 50, Ariens e altri Autori si resero conto del fatto che l'ipotesi dell'occupazione nella sua forma più semplice non spiega l'esistenza di alcuni fenomeni frequentemente osservabili in farmacologia; fra questi, due sono particolarmente importanti: a) esistono farmaci che, pur occupando un determinato recettore, producono una risposta inferiore ad altri che occupano lo stesso recettore, oppure non producono nessuna risposta; b) spesso la curva dose-risposta e la curva di interazione farmaco-recettore non coincidono.

Per spiegare questi fenomeni è stato necessario modificare l'ipotesi dell'occupazione o integrarla con ulteriori ipotesi.

■ Modificazioni alla teoria dell'occupazione

Prima di prendere in considerazione le modificazioni apportate all'ipotesi dell'occupazione, nonché le ipotesi alternative, è opportuno classificare i ligandi da un punto di vista farmacodinamico (Figura 5.8) e dare alcune definizioni.

■ Agonisti e antagonisti

Si definisce *agonista* un farmaco che si lega a un recettore in modo tale da generare una risposta biologica di per sé; generalmente, un agonista mima gli effetti di composti endogeni: ad esempio, il carbacolo è un agonista dei recettori per l'acetilcolina, in quanto mima gli effetti del neurotrasmettitore endogeno. Per *antagonista* in senso stretto, si intende un antagonista recettoriale, cioè un farmaco che, pur legandosi a un recettore, è incapace di produrre un effetto di per sé, ma inibisce (parzialmente o completamente, a seconda della concentrazione) l'effetto di un agonista che agisca attraverso lo stesso recettore.

Il termine antagonista è spesso usato, in senso lato, anche per indicare un antagonista funzionale, di cui esistono due tipi: antagonista fisiologico, cioè un farmaco, o più precisamente un agonista, che produce un effetto contrario a quello di un altro farmaco, e quindi ne inibisce l'azione pur non interagendo con lo stesso recettore; antagonista indiretto, cioè un inibitore di una molecola intermedia fra il recettore e il suo effetto finale (ad esempio, la proteinchinasi C). Per illustrare la differenza fra antagonisti recettoriali e funzionali, si consideri ad esempio l'azione broncocontratturante dell'istamina: essa può essere antagonizzata somministrando sia un farmaco antistaminico (antagonista recettoriale), sia un farmaco β_2 -agonista, che rilassa la muscolatura bronchiale attivando i recettori β_2 -adrenergici (antagonista fisiologico). Nel seguito di questo capitolo ci si occuperà soltanto di antagonisti recettoriali e non di antagonisti funzionali.

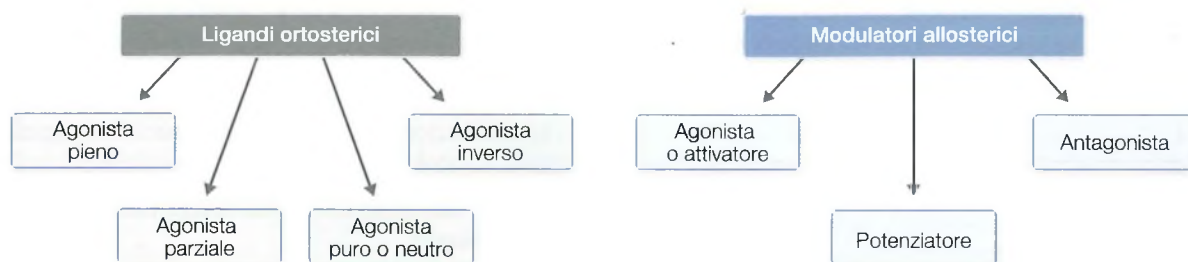


FIGURA 5.8 Classificazione farmacodinamica dei ligandi. I ligandi ortosterici interagiscono con il sito di legame riconosciuto dall'agonista endogeno. I modulatori allosterici interagiscono con un sito che è topograficamente distinto dal sito ortosterico.

Gli antagonisti recettoriali agiscono con meccanismi diversi

Dal punto di vista del meccanismo molecolare, gli antagonisti recettoriali possono essere competitivi o non-competitivi. Tuttavia, è importante ricordare che sullo stesso recettore possono coesistere più siti di legame: per definizione il sito *ortosterico* è quello occupato dall'agonista endogeno, mentre qualunque altro sito di legame sullo stesso recettore è detto *allosterico*.

Antagonisti competitivi

Se il legame fra agonista e antagonista è mutuamente esclusivo l'antagonismo è competitivo. Gli antagonisti competitivi possono produrre un effetto "sormontabile" (reversibile) (Figura 5.9A) o "insormontabile" (irreversibile) (Figura 5.9B), secondo la definizione data da Gaddum e collaboratori nel 1955.

Un antagonista sormontabile sposta la curva dose-risposta dell'agonista in un grafico semi-logaritmico parallelamente verso destra; aumentando la concentrazione di agonista a sufficienza, si può generare lo stesso effetto massimo ottenuto in assenza dell'antagonista. Pertanto, un antagonista di questo tipo aumenta la EC_{50} apparente dell'agonista, senza modificarne l'effetto massimo. Il meccanismo molecolare di un antagonista sormontabile è competitivo, nel senso che esso si lega in modo reversibile generalmente al sito ortosterico; le due molecole, perciò, competono per un sito comune, e l'antagonista sormontabile è spesso chiamato anche semplicemente antagonista competitivo.

Al contrario, un antagonista competitivo *insormontabile* sposta la curva dell'agonista verso destra in modo non parallelo, deprimendo l'effetto massimo ottenibile anche con concentrazioni elevate dell'agonista. Se esiste una relazione lineare fra occupazione del recettore e risposta, la EC_{50} non è modificata, in quanto essa si riferisce all'effetto massimo ottenibile in presenza di entrambi i farmaci. Il meccanismo molecolare consiste in questo caso in un legame irreversibile del composto al sito ortosterico. Dal punto di vista del meccanismo molecolare, l'antagonismo insormontabile può verificarsi anche quando l'antagonista interagisce con un sito di legame sul recettore, diverso da quello occupato dall'agonista. In questo caso si parla di *antagonismo allosterico*.

Modulatori allosterici

I farmaci possono legarsi anche a siti allosterici dei recettori e modificarne così la funzione, la farmacologia e le proprietà biofisiche e vengono classificati come modulatori allosterici. Esistono tre tipi di modulatori allosterici: 1) gli antagonisti allosterici: questi composti possono spostare la curva dose-risposta dell'agonista verso destra in modo non parallelo, modificando l'efficacia ma non la potenza (come per l'antagonista competitivo irreversibile), oppure in modo parallelo, diminuendo contemporaneamente potenza ed efficacia dell'agonista (Figura 5.9C); 2) i potenziatori allosterici: farmaci in grado di aumentare l'affinità e/o l'efficacia di un farmaco ortosterico, ma come gli antagonisti allosterici non hanno effetto da soli; 3) gli agonisti o attivatori allosterici: composti che attivano il recettore da soli, legandosi a un sito diverso da quello ortosterico.

Esistono anche i ligandi allosterici neutri, cioè farmaci che si legano a un sito allosterico sul recettore senza influenzare né il legame né la funzione dell'agonista ortosterico.

Il grafico di Schild permette di capire se un antagonista è competitivo e di calcolarne l'affinità

Poiché, come già detto, un antagonista competitivo sposta la curva dose-risposta dell'agonista verso destra in modo parallelo, la "distanza" fra due curve (cioè il rapporto fra il logaritmo di due dosi di agonista che generino lo stesso effetto in assenza e in presenza di una certa concentrazione di antagonista) è intuitivamente indipendente dalla concentrazione dell'agonista (Figura 5.10A) e dipende invece dalla potenza e dalla concentrazione dell'antagonista. Nel 1947 Schild ha dimostrato che:

$$\log(DR - 1) = \log[A] - \log K_a \quad [15a]$$

oppure

$$\log(DR - 1) = \log[A] + pA_2 \quad [15b]$$

dove DR (*Dose Ratio*) indica il rapporto tra le dosi, [A] la concentrazione dell'antagonista competitivo, K_a la costante di dissociazione del suo complesso con il recettore (cioè $K_a = [A][R]/[AR]$) e $pA_2 = -\log K_a$.

Il grafico di $\log(DR-1)$ in funzione di $\log[A]$ è quindi una retta con pendenza = 1 e intercetta sull'asse delle

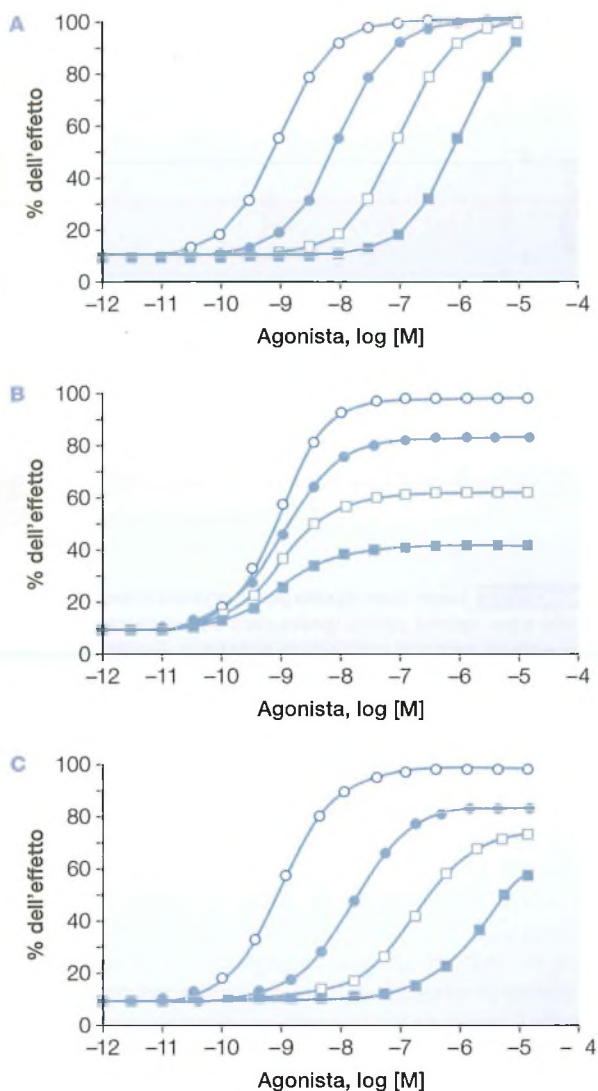


FIGURA 5.9 Modificazione della curva dose-risposta di un agonista in presenza di concentrazioni crescenti di un antagonista competitivo sormontabile (A), competitivo irreversibile (B) o allosterico (C). I parametri utilizzati sono i seguenti: $K_d = 1$ nM costante di dissociazione dell'agonista; $K_d = 1$ nM costante di dissociazione dell'antagonista; A. concentrazioni dell'antagonista: 0 (○), 1 (●), 10 (□), 100 (■) nM. In B e C concentrazioni dell'antagonista insormontabile (irreversibile (B) o allosterico (C) tali da inattivare rispettivamente 0 (○), 20 (●), 40 (□) e 60 (■) % dei recettori presenti.

ascisse = $\log K_i = -pA_2$, come mostrato in figura (Figura 5.10B).

L'analisi dell'effetto di un antagonista secondo Schild permette quindi; a) di capire se un antagonista è competitivo dalla pendenza della retta (che soltanto in questo caso è uguale a 1); b) di calcolarne l'affinità per il recettore, indice della sua potenza.

Teoria dell'efficacia o attività intrinseca

L'esistenza di antagonisti, che pur legandosi allo stesso recettore a cui si lega l'agonista non producono di per

sé alcun effetto, contraddice la teoria dell'occupazione, poiché in questo caso l'effetto non dipende soltanto dall'occupazione del recettore stesso. Per superare questo limite della teoria dell'occupazione, Ariens e Stephenson, indipendentemente l'uno dall'altro, hanno proposto che i farmaci siano dotati di due proprietà distinte:

- la prima è l'*affinità* per il recettore, già discussa e correlata all'interazione farmaco-recettore ($R + X \rightleftharpoons RX$ nella [1]); è un indice della potenza di un farmaco e si riflette nella posizione della curva dose-risposta sull'asse delle ascisse;
- la seconda è l'*efficacia o attività intrinseca*, definita come la capacità del farmaco di dare inizio alla risposta biologica, una volta che esso si sia legato al recettore ($RX \rightarrow RX^*$); è correlata alla probabilità di indurre un cambiamento di conformazione nel recettore, che renda quest'ultimo capace di generare la risposta e si riflette nell'estensione della curva sull'asse delle ordinate.

Secondo questa teoria, la [14] si trasforma nella seguente:

$$\bar{\Delta} = \frac{[X] \cdot \Delta_{\max} \cdot \alpha}{EC_{50} + [X]} \quad [16]$$

dove α rappresenta l'attività intrinseca e può assumere valori compresi fra 0 e 1; più precisamente, per un agonista $\alpha = 1$; per un antagonista $\alpha = 0$. Per quei farmaci dotati di un valore di α intermedio tra 0 e 1, Stephenson ha coniato il termine di *agonista parziale*, ma sono stati chiamati anche "dualisti" da Ariens (Figura 5.11). Fenoldopam rappresenta un esempio di agonista parziale del recettore dopaminergico, in quanto, pur agendo attraverso lo stesso recettore della dopamina, non raggiunge lo stesso rilassamento massimale della muscolatura liscia raggiungibile con l'agonista endogeno.

■ Gli agonisti parziali

La teoria dell'attività intrinseca predice che, quando tutti i recettori presenti sono occupati da un agonista parziale, si ottiene un effetto $\Delta = \Delta_{\max} \cdot \alpha$. Essa prevede inoltre che un agonista parziale abbia caratteristiche intermedie fra quelle di un agonista e quelle di un antagonista ("dualista"), e sia quindi in grado di inibire parzialmente la risposta generata da un agonista completo. Questa previsione è stata naturalmente verificata sperimentalmente, e la figura 5.12 mostra la curva dose-risposta di un agonista pieno in assenza o in presenza di concentrazioni fisse di un agonista parziale (grafico 5.12A) e, viceversa, di un agonista parziale in assenza o in presenza di concentrazioni fisse di un agonista pieno (grafico 5.12B). In entrambi i casi è evidente il carattere da agonista/antagonista dell'agonista parziale; infatti, la figura 5.12A mostra che l'agonista parziale ha un effetto additivo a quello di basse concentrazioni dell'agonista pieno (in presenza dell'agonista parziale, l'effetto dell'agonista pieno alle basse concentrazioni è più alto del corrispondente effetto in assenza dell'agonista parziale). Ciò avviene per concentrazioni dell'agonista pieno che generino un effetto inferiore a quello massimo dell'agonista parziale, 30%

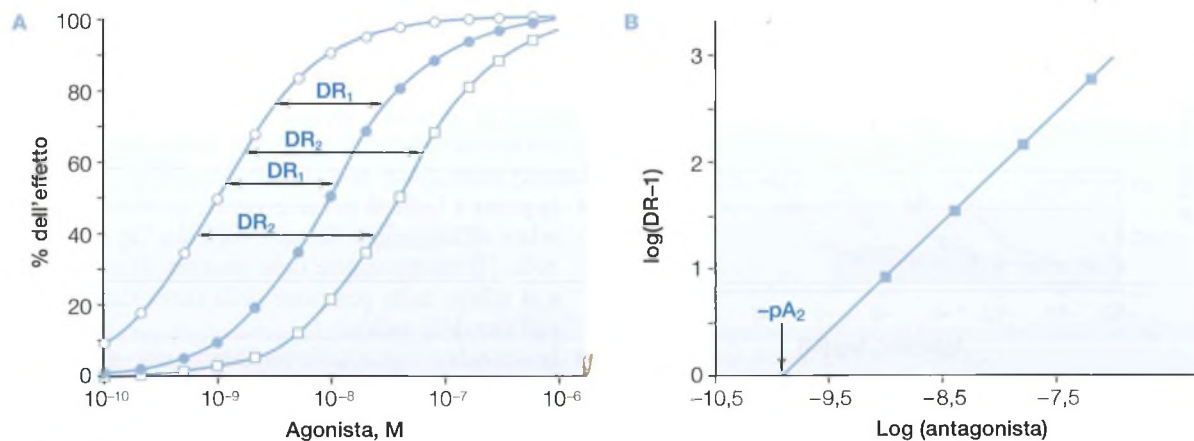


FIGURA 5.10 A. Dose-ratio (DR, rapporto di dosi = distanza fra curve dose-risposta). B. Grafico di Schild per un antagonista sormontabile.

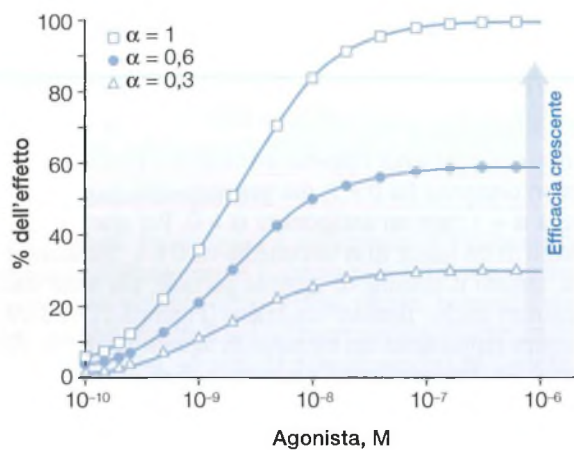


FIGURA 5.11 Curve dose-risposta per un agonista pieno (quadrato vuoto) e per agonisti parziali (pallini pieni e triangoli vuoti). I valori di α = attività intrinseca sono indicati nella figura. Fenoldopam è un esempio di agonista parziale: rilassa i vasi sanguigni di molti distretti, ma il suo effetto massimo è minore di quello della dopamina, attraverso il cui recettore agisce.

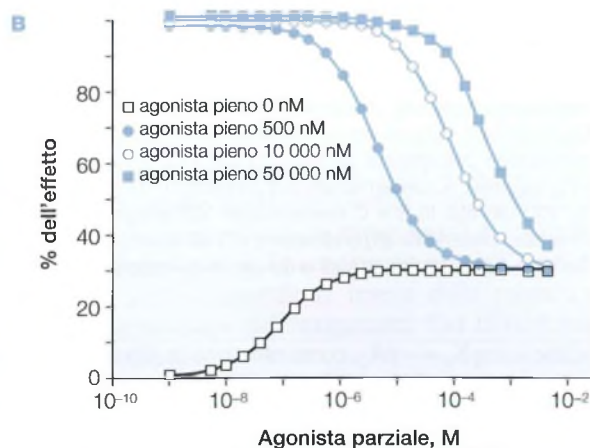
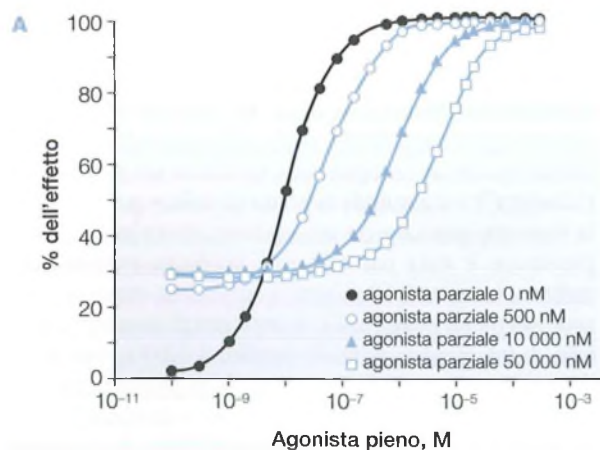


FIGURA 5.12 Curve dose-risposta per un agonista pieno (A) in presenza di concentrazioni crescenti di un agonista parziale e di un agonista parziale (B) in presenza di concentrazioni crescenti di agonista pieno. In questo esempio $\alpha = 0,3$, $EC_{50} = 10$ nM per l'agonista pieno e 100 nM per l'agonista parziale.

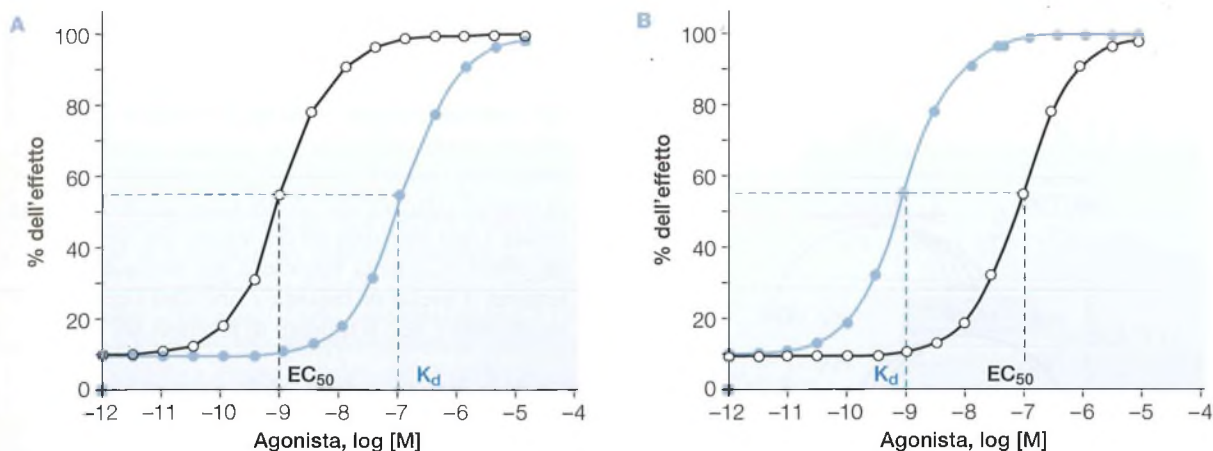


FIGURA 5.13 Separazione fra curva dose-risposta e curva di interazione farmaco-recettore nel caso di esistenza di recettori di riserva (A) o di soglia di occupazione (B).

del massimo ($\alpha = 0,3$) in questo esempio. A concentrazioni maggiori dell'agonista pieno, le curve ottenute in presenza di concentrazioni crescenti di agonista parziale appaiono sempre più spostate verso destra: occorre infatti che l'agonista pieno vinca la sua competizione sul sito di legame, per produrre un effetto che sia superiore a quello massimo generato dall'agonista parziale. In questa fase della relazione concentrazione-effetto l'agonista parziale si comporta quindi da antagonista competitivo. Nell'esperimento di figura 5.12B, l'effetto dell'agonista parziale da solo è paragonato a quelli prodotti in presenza di dosi massimali (capaci di produrre il massimo dell'effetto) dell'agonista pieno. Si noti come l'effetto dell'agonista pieno tenda a ridursi in presenza di alte concentrazioni di agonista parziale; a differenza di una curva di competizione con un antagonista, in questo caso l'inibizione dell'effetto non è completa, ma le curve di agonista pieno in presenza di agonista parziale scendono solo fino al valore corrispondente all'effetto massimo di quest'ultimo (30%).

È altresì chiaro dalla [16] che per un agonista parziale il valore di EC₅₀ è diverso da K_d, cioè che le curve dose-risposta e le curve di interazione farmaco-recettore non sono coincidenti (Figura 5.13A).

Non linearità della relazione tra occupazione e risposta: EC₅₀ e K_d non coincidenti

In realtà si verifica spesso il caso in cui la curva dose-risposta si trova a sinistra della curva di interazione farmaco-recettore (Figura 5.13A), o, meno frequentemente, alla sua destra (Figura 5.13B), cioè appunto EC₅₀ è diversa da K_d.

Dal punto di vista pratico la curva dose-risposta può essere situata sia a sinistra sia a destra della curva di binding. Di seguito esaminiamo le condizioni in cui ciò può avverarsi.

Curva dose-risposta a sinistra della curva di binding

Esistono diverse possibilità per spiegare il fatto che la curva dose-risposta sia a sinistra della curva di binding.

- Agonisti parziali (vedi sopra).
- Un sistema a cascata amplifica il segnale

Le curve dose-risposta e quelle di binding possono essere separate fra loro anche di molti ordini di grandezza, se la risposta misurata non è generata immediatamente dall'attivazione del recettore, cioè se fra i due fenomeni si frapponono una cascata di reazioni, che generalmente comprende anche la formazione di secondi messaggeri.

Un esempio particolarmente ben studiato, fra i moltissimi esistenti, è costituito dalla stimolazione ormonale della glicogenolisi (Figura 5.14): le curve di interazione glucagone-recettore e di produzione di glucosio sono separate di 8 ordini di grandezza, corrispondenti a un fattore di amplificazione di 10⁸.

Per uno stesso recettore, la separazione fra la curva di binding e quella dose-risposta dipende dal tipo di risposta preso in considerazione: nella figura 5.15 è mostrato un esempio di come le curve di binding e dose-risposta possono differire non solo per la posizione (binding e contrazione) ma anche per forma (binding e captazione di calcio radioattivo).

- Si può ottenere la risposta massima occupando soltanto una frazione di recettori

La situazione di figura 5.13A si verifica quando si raggiunge la risposta massima del sistema in esame avendo occupato soltanto una frazione dei recettori presenti. Questo concetto, introdotto per la prima volta da Stephenson nel 1956, è stato verificato direttamente 10 anni più tardi da Furchgott e collaboratori, i quali dimostrarono che era possibile raggiungere la risposta massima anche dopo aver inattivato frazioni crescenti dei recettori presenti, mediante alchilazione irreversibile.

In questo caso, i recettori rimanenti vengono definiti

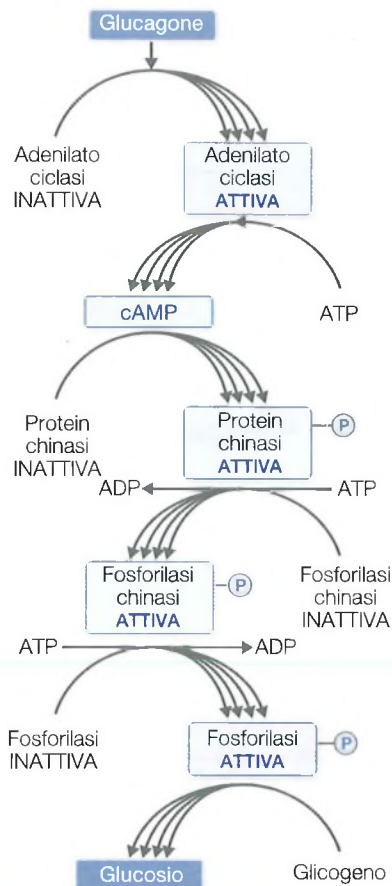


FIGURA 5.14 Meccanismo di amplificazione a cascata del segnale. L'esempio riguarda l'attivazione della glicogenolisi da parte del glucagone. Il fattore di amplificazione della risposta a ogni passaggio varia fra 10^2 e 10^6 .

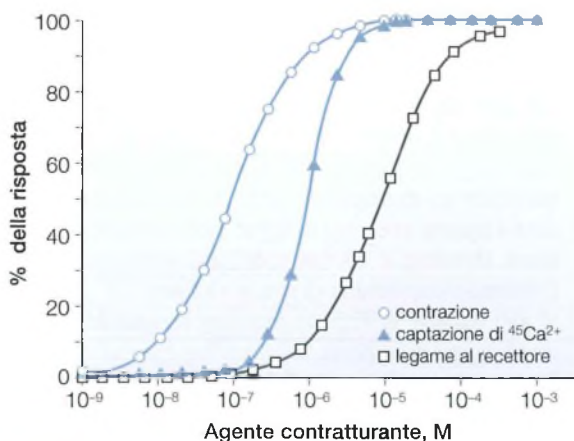


FIGURA 5.15 La curva dose-risposta può essere spostata sull'asse delle x e/o avere pendenza o forma diverse rispetto alla curva di binding (curva grigia). Per uno stesso farmaco, posizione, pendenza e forma della curva dose-risposta possono variare se vengono presi in considerazione effetti diversi, in questo caso aumento della captazione di Ca^{2+} radioattivo e contrazione.

con il termine “recettori di riserva” (*receptor reserve*), anche se questo termine è ormai considerato ambiguo per due motivi: a) la grandezza della riserva dipende dal livello di risposta misurata (ad esempio, la “riserva” può essere differente alla risposta massima o alla metà della risposta massima); b) il termine “recettori di riserva” connota una proprietà del tessuto, quando invece è una proprietà sia del tessuto che del farmaco (in effetti è l'attività intrinseca del farmaco che determina il livello di risposta a una data occupazione recettoriale e non il numero di recettori nel tessuto).

Curva dose-risposta a destra della curva di binding

Come accennato prima, meno frequente è il caso in cui la curva dose-risposta sia alla destra della curva di binding (Figura 5.13B).

La condizione si verifica in genere quando la concentrazione del recettore sia elevata, e quindi non sia trascurabile rispetto alla concentrazione del farmaco, cioè in pratica quando stiamo violando l'assunzione per cui la reazione $[R] + [X] \rightarrow [RX]$ avvenga in eccesso di farmaco. In questo caso si verifica che i farmaci devono occupare una frazione dei recettori presenti prima che si verifichi un effetto: si parla allora di “soglia di occupazione”

Recettori costitutivamente attivi e agonisti inversi

I recettori costitutivamente attivi possono generare una risposta biologica anche in assenza del ligando

Secondo la teoria “classica”, il complesso farmaco-recettore, RX , è l'unica entità in grado di generare una risposta biologica, mentre R o X (nel caso di farmaci che agiscono attraverso un recettore) sarebbero di per sé inattivi. All'inizio degli anni 90 ci si è resi conto che l'affermazione non è vera; in altre parole, è stato dimostrato che molti recettori, particolarmente quelli a proteine G (*G Protein Coupled Receptors*, GPCR, vedi Capitolo 13), ma anche altri tipi (ad esempio i recettori canale, vedi Capitolo 12 e i recettori per i fattori di crescita, vedi Capitolo 14), hanno una certa capacità di suscitare un segnale anche in assenza del ligando. I recettori nella conformazione capace di generare la risposta anche in assenza di ligando sono definiti *recettori costitutivamente attivi*.

La loro scoperta è avvenuta in modo fortuito quando sono state introdotte mutazioni in una certa zona (la 3^a ansa citoplasmatica, vedi Capitolo 13) dei recettori adrenergici α_{1B} e β_2 : i recettori mutati erano in grado di esplicare la loro azione biologica anche in assenza di ligando; risultati simili sono poi stati ottenuti con mutazioni di altri recettori. Ci si è resi conto poi che le mutazioni non inducevano l'attivazione costitutiva, ma semplicemente la rendevano più evidente; in altre parole, anche i recettori non mutati posseggono, pur se in piccola misura, la capacità di generare un segnale in assenza di un agonista, segnale che in molti sistemi naturali è difficilmente rilevabile e che rappresenta il cosiddetto effetto basale o attività basale.

La scoperta dei recettori costitutivamente attivi ha portato a formulare l'ipotesi di un modello recettoriale a due stati e l'esistenza di una nuova classe di ligandi chiamati "agonisti inversi".

La teoria "classica" prevede (equazione [2]) che il ligando, legandosi al recettore, ne induca il cambiamento da una conformazione biologicamente inattiva a una attiva, capace cioè di trasdurre un segnale. Secondo la teoria dell'attivazione costitutiva, invece, i recettori esistono naturalmente in (almeno) 2 stati possibili (Figura 5.16): R, inattivo e R* attivo, in equilibrio tra loro. In condizioni basali, l'equilibrio è spostato nettamente verso R e quindi l'esistenza di R* è difficilmente rilevabile. Nel caso dei recettori mutati a cui si è accennato più sopra, l'equilibrio è invece spostato in modo più o meno marcato verso R* e pertanto si osserva un effetto biologico rilevante anche in assenza di ligando. Nel caso della sovraespressione di un recettore non mutato, invece, l'equilibrio fra R e R* non cambia, ma è notevolmente aumentata la quantità assoluta di recettori espressi e quindi la quantità sia di R che di R*, cosicché l'attività costitutiva diventa apprezzabile, perché amplificata.

Ad esempio, la sovraespressione del recettore β_2 -adrenergico in ratti transgenici ha mostrato che l'atrio sinistro di tali ratti aveva una tensione basale (cioè in assenza di ligando) tre volte più alta dell'atrio di ratti normali e che tale tensione non poteva più essere aumentata dalla somministrazione dell'agonista β -adrenergico isoprenalina, come avveniva invece negli animali normali.

Pertanto, nell'ambito di questa ulteriore modifica della teoria dell'occupazione, si definisce agonista il farmaco che mostra un'affinità per R* maggiore che per R: la formazione del complesso R*X sarebbe quindi favorita; R* verrebbe sottratto dall'equilibrio e ciò indurrebbe una trasformazione di R in R* (Figura 5.16).

L'esistenza di recettori costitutivamente attivi, e quindi di un modello recettoriale a due stati, ha come logica conseguenza l'esistenza degli agonisti inversi, cioè di farmaci che, avendo affinità maggiore per R che per R*, facilitano la formazione di RX spostando l'equilibrio fra R e R* a favore del primo e destabilizzando quindi la conformazione biologicamente attiva del recettore. Gli agonisti inversi, pertanto, hanno azione opposta a quella degli agonisti e sono gli unici farmaci in grado di diminuire l'attività basale di un sistema. La loro attività intrinseca α sarà quindi compresa tra 0 e -1.

Di fatto, agonisti e agonisti inversi selezionano lo stato del recettore per cui hanno più affinità e contemporaneamente tendono a indurlo: si tratta di una differenza sostanziale rispetto alla teoria classica, dove l'agonista induce semplicemente la formazione di uno stato attivo inesistente in assenza del ligando stesso.

Gli agonisti inversi non vanno confusi con gli antagoni-

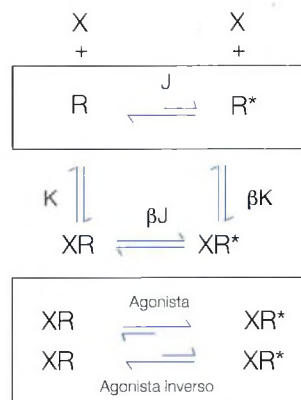
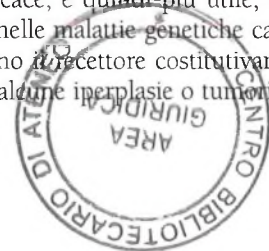


FIGURA 5.16 Modello recettoriale a due stati. R: stato inattivo; R*: stato attivo; K: affinità; J: costante di isomerizzazione; β : adimensionale. Agonista è quel farmaco che avendo un'affinità maggiore per R* che per R facilita la formazione del complesso R*X e quindi sposta l'equilibrio fra R e R* a favore del secondo. Al contrario, agonista inverso è quel farmaco che avendo un'affinità maggiore per R che per R* facilita la formazione di RX e quindi sposta l'equilibrio fra R e R* a favore del primo.

sti veri e propri (detti anche antagonisti puri o neutri): questi ultimi hanno la stessa affinità per R e R* e quindi non influenzano l'equilibrio fra le due conformazioni; sono naturalmente in grado di inibire l'azione sia degli agonisti sia degli agonisti inversi, ma non sono in grado di inibire l'effetto basale. È probabile che gli antagonisti veri e propri siano, in realtà, piuttosto rari e che molti dei composti conosciuti come antagonisti rivelino, in sistemi biologici dove l'attività costitutiva dei recettori sia misurabile, proprietà più o meno marcate da agonista inverso. Infatti, in seguito alle prime evidenze e a conferma delle ipotesi sopra riportate, numerosi sono stati gli agonisti inversi scoperti, molti dei quali erano stati considerati antagonisti per la mancanza di esaltazione dell'attività costitutiva dei recettori. Ad esempio, il composto ICI 118,551, noto come antagonista selettivo β_2 , si è dimostrato in grado di diminuire la tensione basale nell'atrio sinistro dei ratti transgenici in cui il recettore β_2 -adrenergico era stato sovraespresso. Alcuni farmaci commercializzati inizialmente come antagonisti si sono poi rivelati agonisti inversi, ad esempio: prazosin e metoprololo (rispettivamente per recettori α_1 e β_1 -adrenergici); losartan (recettore AT₁ dell'angiotensina); aloperidolo (recettore dopaminergico D₂); cetirizina e cimetidina (rispettivamente per i recettori H₁ e H₂ dell'istamina).

Dal punto di vista terapeutico è ipotizzabile che un agonista inverso sia più efficace, e quindi più utile, di un antagonista ad esempio nelle malattie genetiche causate da mutazioni che rendono il recettore costitutivamente attivo, come nel caso di alcune iperplasie o tumori.



TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'interazione farmaco-recettore deve essere: sensibile, selettiva, specifica, saturabile, mantenere un determinato profilo farmacologico e una correlazione fra attività biologica e legame recettoriale.
- ▶ Dal punto di vista farmacodinamico i farmaci possono essere classificati in agonisti, agonisti parziali, antagonisti e agonisti inversi.
- ▶ In base al sito recettoriale con cui interagiscono, i farmaci sono definiti ortosterici o allosterici.
- ▶ I parametri quantitativi fondamentali che regolano l'interazione farmaco-recettore sono l'affinità e la potenza, il numero di recettori e l'efficacia, l'attività intrinseca.

Bibliografia essenziale

- ▶ Costa T, Cotecchia S. Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:618-24.
- ▶ Kenakin T, Miller LJ. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev* 2010;62:265-304.
- ▶ Kenakin TP, Bond RA, Bonner TI. Definition of pharmacological receptors. *Pharmacol Rev* 1992;44:351-62.
- ▶ Kenakin TP. New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:919-27.
- ▶ Kenakin TP. *Pharmacological Analysis of Drug-receptor Interactions*. New York: Raven Press, 1987.
- ▶ May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;47:1-51.
- ▶ Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* 2003;55:597-606.

Recettori e modulazione delle risposte recettoriali

CAPITOLO

6

Francesco Clementi, Guido Fumagalli

Obiettivi formativi

- Conoscere i diversi recettori per ligandi endogeni attraverso lo studio della loro classificazione in base alla struttura molecolare
- Comprendere i principi generali che governano la sensibilità a farmaci attivi su recettori di ligandi endogeni

Per potersi adattare alla variazione dell'ambiente in modo coordinato con il resto dell'organismo o svolgere funzioni specifiche di entità e durata controllata, le cellule di un tessuto o di un organismo devono comunicare tra loro. La comunicazione avviene per lo più attraverso la produzione e liberazione di molecole, chiamate *mediatori* o *trasmettitori* o *ormoni*, capaci di diffondere dal sito di produzione e di legare in modo specifico componenti della cellula ricevente, chiamati *recettori*. Il recettore è non solo capace di riconoscere e legare il mediatore ma anche, attraverso una modifica della sua struttura, di generare una risposta cellulare.

La maggioranza dei farmaci attualmente a disposizione agisce attraverso la interazione con recettori per mediatori endogeni; la loro attività è funzione non solo del numero di recettori con cui interagiscono, ma anche delle proprietà biologiche, della regolazione funzionale, della distribuzione tissutale e delle modificazioni patologiche di questi ultimi. Come descritto nel Capitolo 5, un farmaco può stabilizzare un recettore nel suo stato attivo (farmaco agonista) o nel suo stato "di riposo" (farmaco antagonista che, di fatto, impedisce l'attivazione del recettore da parte del mediatore). Per quei recettori in cui l'attività basale "a riposo" è particolarmente elevata, è anche possibile che l'interazione con un farmaco porti a una significativa riduzione dello stato di attivazione (agonista inverso).

La conoscenza dei meccanismi molecolari e cellulari che sottendono le risposte recettoriali fornisce la chiave di volta per la comprensione della moderna farmacologia. Gli studi di biologia molecolare hanno permesso di acquisire una approfondita conoscenza della struttura molecolare dei recettori, di produrre classificazioni basate sulla loro struttura primaria e di dimostrare che

ogni recettore è presente in molti sottotipi, ciascuno dotato di proprie caratteristiche biofisiche e farmacologiche. La numerosità dei sottotipi recettoriali è ben più ampia di quanto precedentemente stimato sulla base delle caratteristiche di efficacia e legame dei farmaci. L'abbondanza di sottotipi recettoriali che riconoscono uno stesso mediatore/ormone sottolinea la duttilità del sistema di comunicazione cellulare che, attraverso un singolo trasmettitore, è capace di innescare eventi biologici diversi a seconda del tipo di cellule e del loro stato funzionale. La recente dimostrazione che minime differenze di sequenza amminoacidica (anche a livello di singolo nucleotide) comportano l'esistenza di recettori dotati di caratteristiche strutturali e funzionali differenti può inoltre contribuire a spiegare la diversa risposta (in termini quantitativi e qualitativi) ai farmaci registrabile a livello individuale di una popolazione (vedi Capitolo 54). L'abbondanza e la specificità tissutale dei sottotipi recettoriali, se da un lato possono rappresentare una complicazione per lo studente e per l'industria del farmaco, dall'altro aprono nuove e interessanti prospettive per una farmacologia altamente selettiva.

Classi di recettori e loro sistemi di trasduzione del segnale

Sono qui presi in considerazione i recettori per sostanze modulatorie endogene. In questo contesto per *recettore* si intende una molecola capace di legare con proprie caratteristiche di specificità e affinità uno o più mediatori endogeni e che da questo legame subisce una trasformazione conformazionale da cui scaturisce un effetto biologico. Non rientrano in questa classificazione

quelle proteine che, pur capaci di legare un modulatore endogeno, non producono segnali biologici direttamente connessi a tale legame. Esempi di proteine leganti ormoni ma prive di capacità di trasduzione del segnale sono le proteine plasmatiche leganti gli estrogeni o gli ormoni tiroidei (vedi CD: Approfondimento 6.1. *Nascita ed evoluzione della teoria dei recettori*).

In base alla localizzazione subcellulare, i recettori si dividono in due grandi classi: *recettori di membrana* e *recettori intracellulari/nucleari*. I primi trasducono il segnale portato da mediatori idrofili che difficilmente passano la membrana cellulare (neurotrasmettitori classici e peptidici, fattori di crescita, citochine ecc.); i secondi trasducono il segnale portato da ormoni e altri mediatori lipofili che diffondono facilmente attraverso le membrane cellulari (ormoni steroidei e tiroidei, acido retinoico, vitamina D ecc.).

Le due classi di recettori differiscono anche per il meccanismo di trasduzione del segnale. I *recettori di membrana* trasducono il segnale generando modificazioni delle concentrazioni ioniche intracellulari o attraverso la generazione di secondi messaggeri o stimolando la formazione di macrocomplessi molecolari biologicamente attivi; i *recettori intracellulari* sono invece fattori di trascrizione che, interagendo con sequenze specifiche del DNA, inducono modificazioni dell'espressione genica e quindi della composizione proteica della cellula.

Questa divisione scolastica ha sempre più eccezioni. Ad esempio, gli estrogeni possono attivare una risposta cellulare lenta legandosi a recettori intracellulari (ER α e ER β) e una risposta veloce legandosi a recettori di membrana (GPER1/GPR30); spesso l'attivazione di recettori di membrana (recettori per le citochine, recettori a tirosinchinasi, recettori accoppiati a proteine G) porta all'attivazione di fattori di trascrizione, al loro trasporto nel nucleo e alla modificazione della trascrizione di geni.

Recettori intracellulari/intranucleari

I recettori intracellulari legano il DNA e modulano la trascrizione genica

Sono stati fino a oggi identificati 48 potenziali recettori per ligandi idrofobici, raggruppati in 6 famiglie. Circa la

metà di questi potenziali recettori sono in realtà "orfani", cioè non se ne conosce né il ligando né la funzione (la loro inclusione in questa categoria di recettori è basata sull'omologia di sequenza); la rimanente metà comprende recettori importanti come quelli per gli ormoni sessuali, per i glucocorticoidi, per i mineralcorticoidi, per gli ormoni tiroidei, per le vitamine A e D, per i proliferatori dei perossisomi (PPAR), per gli acidi retinoici e per altri lipidi. Essi sono fattori di trascrizione attivati da ligando capaci di legare sequenze consenso-specifiche del DNA dei promotori di geni specifici, regolandone la trascrizione (vedi Capitolo 19). I componenti di questa famiglia sono molto simili tra loro dal punto di vista strutturale essendo composti da una singola catena polipeptidica in cui si riconoscono tre territori: uno al terminale carbossilico deputato al legame specifico con l'ormone, uno centrale nel quale vi è il sito di riconoscimento per sequenze specifiche di DNA, il terzo al terminale amminico che è essenziale per la specificità d'azione a livello di transattivazione. In assenza di ligando, il recettore è presente nel citoplasma o nel nucleo in forma inattiva; lo stato quiescente è mantenuto dall'interazione con proteine inibitorie specifiche, per lo più della classe delle *heat shock proteins* (hsp). Il legame dell'ormone, o di un farmaco agonista, produce un cambiamento conformazionale tale da dissociare il recettore dalle hsp consentirne la dimerizzazione e, se nel citoplasma, il trasferimento nel nucleo. Qui si associa a sequenze specifiche, dette *Responsive Elements* (RE), presenti nei promotori di alcuni geni sensibili la cui trascrizione viene così regolata in funzione della presenza dell'ormone (Figura 6.1). L'attività di questi recettori è modulata dal legame anche di coattivatori o corepressori. I farmaci analoghi degli ormoni steroidei, sia agonisti che antagonisti, agiscono interferendo con l'attivazione recettoriale (per una descrizione più dettagliata vedi Capitoli 19 e 20).

Recettori di membrana

I recettori di membrana mediano il passaggio dell'informazione attraverso la membrana plasmatica

L'analisi del genoma umano e le ricerche di proteomica hanno portato all'identificazione di più di mille recettori

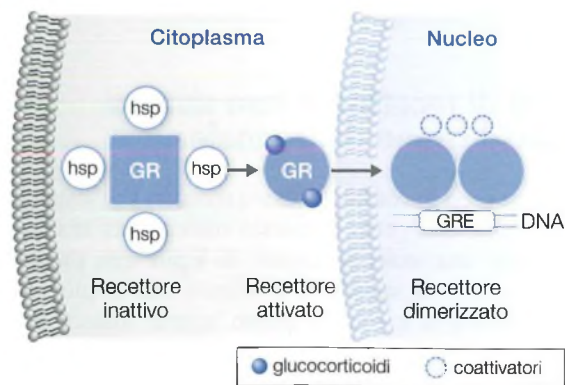


FIGURA 6.1 Schema del meccanismo di trasduzione del segnale dei recettori per gli ormoni steroidei. Gli ormoni e le molecole lipofile possono passare la membrana cellulare e attivare un recettore intracellulari. In questo esempio è illustrato il recettore per i glucocorticoidi (GR) che è citoplasmatico, ma alcuni recettori di questo tipo sono nucleari. Il GR è associato a delle *heat shock proteins* (hsp) e in forma monomera e inattivo. Quando il glucocorticoide si lega al recettore, esso cambia conformazione, si dissocia dalle hsp inibitorie, dimerizza e può essere trasportato nel nucleo. Qui interagisce con sequenze specifiche di DNA, dette *Glucocorticoid-Responsive Elements* (GRE) presenti nel promotore di geni sensibili ai glucocorticoidi e recluta proteine coattivatrici o corepressorie. In tal modo il complesso recettoriale attiva o inibisce la trascrizione del gene.

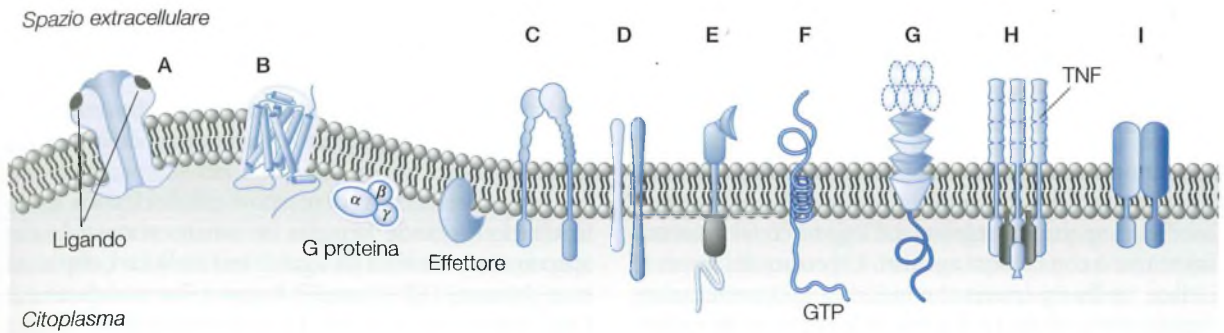


FIGURA 6.2 Rappresentazione schematica delle varie famiglie di recettori di membrana. A. Canali ionici aperti dal legame con il neurotrasmettitore. B. Recettori accoppiati a proteine G con la caratteristica struttura a sette zone transmembranarie. C. Recettori per la matrice extracellulare (integrine). D. Recettori per le citochine. E. Recettori che possiedono attività proteinchinasi intrinseca (cilindro grigio) che fosforila residui di tirosina e/o serina. F. Recettori che possiedono un'attività guanilato ciclasica intrinseca. G. Recettori per le lipoproteine. H. Recettori per il TNF o recettori di morte. I. Recettori "toll-like".

diversi espressi sulla membrana plasmatica delle cellule umane che possono essere raggruppati in venti famiglie recettoriali distinguibili per struttura e funzione. Per alcuni di questi recettori non si conoscono i ligandi endogeni e quindi si parla di "recettori orfani" (vedi **CD**: Approfondimento 13.1.). In questo testo verranno analizzati solo i recettori più rilevanti per i quali sono disponibili strumenti farmacologici e che si possono raggruppare in nove grandi famiglie, ciascuna delle quali composta da numerosi membri: recettori-canale, recettori accoppiati alle proteine G, recettori dotati di attività tirosinchinasi intrinseca, recettori dotati di attività guanilato ciclasica intrinseca, recettori per l'adesione e il movimento cellulare, recettori per le citochine, recettori per il *Tumor Necrosis Factor* (TNF), recettori "toll-like" e recettori per le lipoproteine (Figura 6.2).

Molti dei neurotrasmettitori stimolano recettori appartenenti a famiglie diverse, in particolare recettori-canale e recettori accoppiati a proteine G (Tabella 6.1). Come verrà illustrato in dettaglio in seguito e in altri capitoli, l'attivazione di un recettore-canale comporta flussi ionici transmembrana e genera eventi rapidi e di breve durata, mentre l'attivazione di un recettore accoppiato a proteina G genera una risposta più lenta e di maggiore durata. La stimolazione di recettori diversi da parte di uno stesso neurotrasmettitore comporta quindi differenze che non sono solo qualitative (tipo di risposta) ma anche cinetiche (velocità d'insorgenza e durata della

risposta). La conoscenza dei tipi recettoriali presenti in una cellula è quindi utile per prevedere quale sarà la sua risposta a un determinato neurotrasmettitore o farmaco. Allo stesso tempo è importante considerare che una singola cellula è spesso bersagliata da stimoli/trasmittitori diversi. La risposta finale della cellula dipende quindi dai tipi di recettore che essa esprime e dalle interazioni (cross-talk) che possono aver luogo tra i vari recettori e i loro sistemi di trasduzione del segnale (vedi Capitolo 11).

A complicare ancor più la situazione si sono aggiunti negli ultimi anni numerosi dati che indicano come le proteine recettoriali agiscano spesso non da "single" ma "in coppia", organizzate in omodimeri o omopolimeri (fatto che può avere importanti effetti su parametri come l'affinità per il trasmettitore e l'efficienza del sistema di trasduzione del segnale) o anche in eterodimeri/polimeri (costituiti cioè da proteine recettoriali diverse e sensibili ad agonisti differenti) dotati di proprietà farmacologiche e funzionali assai diverse dai recettori monomerici di partenza. Questa strategia è ampiamente utilizzata in natura, ad esempio da parte dai recettori delle chemochine per ampliare la risposta antinfiammatoria e adattarla alle diverse esigenze.

In questo capitolo vengono riportate in breve le caratteristiche tipiche delle diverse famiglie recettoriali e i loro meccanismi di trasduzione del segnale, rimandando per i dettagli ai capitoli dedicati ai singoli tipi di recettore.

TABELLA 6.1 Neurotrasmettitori con recettori a trasduzione del segnale veloce e lenta

Neurotrasmettitore	Risposta veloce	Risposta lenta
Acetilcolina	Nicotinici	Muscarinici
GABA	GABA _A	GABA _B
Glutammato	Ionotropi (AMPA, Kainico, NMDA)	Metabotropi (mGLUR1-mGLUR8)
Serotonina	5-HT ₃	5-HT _{1,2,4,5}
ATP	P _{2x}	P _{2y}

Recettori-canale

Sono canali attivati da ligando che consentono il passaggio selettivo di ioni lungo il gradiente elettrochimico

I recettori-canale sono complessi macroproteici transmembranari che formano un canale ionico la cui probabilità di apertura è regolata dal legame con il neurotrasmettitore o con farmaci agonisti. L'apertura del recettore induce un flusso ionico che modifica le concentrazioni ioniche intracellulari e il potenziale elettrico transmembranario. Essi sono tipicamente (ma non esclusivamente) espressi a livello delle sinapsi interneuronali e neuromuscolare. A questa famiglia appartengono i recettori colinergici nicotinici, i recettori GABA_A e GABA_C per il GABA, il recettore per la glicina, i recettori ionotropi per il glutammato, il recettore 5-HT₃ per la serotonina, i recettori P_{2x} per le purine e i canali attivati da protoni. I recettori-canale sono composti da 3-5 subunità che delimitano un canale idrofilico attraverso il quale passano in modo controllato e selettivo gli ioni; l'energia per il loro movimento è data dalla differenza di concentrazione dello ione a cavallo della membrana cellulare. Nel complesso sopramolecolare si possono distinguere tre zone morfofunzionali.

1. La porzione extracellulare, generalmente di grandi dimensioni, che delimita una larga camera a imbuto dove si concentrano gli ioni e dove sono localizzati i siti di legame per i neurotrasmettitori o altri ligandi. I siti di legame sono generalmente posti tra due subunità del recettore-canale (ad esempio, l' α e la β nel recettore nicotinico), e ambedue le subunità adiacenti contribuiscono a definire le proprietà del sito di legame. A livello della porzione extracellulare sono presenti siti di legame allosterici.
2. La porzione intramembranaria, situata alla fine dell'imbuto, che costituisce il poro ionico vero e proprio. Il poro seleziona gli ioni in base alla dimensione e alla carica; a questa azione di filtro contribuiscono amminoacidi carichi disposti in più anelli lungo la superficie interna del canale. Si ritiene che l'apertura del canale, indotta dal legame con il neurotrasmettitore, sia dovuta a modificazione conformazionale di una o più subunità, evento che causa uno slittamento delle stesse e conseguente variazione del calibro del canale che esse delimitano. I farmaci che si legano al recettore a questo livello interferiscono con le cinetiche di apertura e chiusura del canale ionico.
3. La porzione intracitoplasmatica, che presenta siti di fosforilazione, importanti per la regolazione delle cinetiche di apertura e chiusura del canale ionico, e siti di legame con proteine adattatrici che legano il recettore al citoscheletro e ne garantiscono la stabilità e la corretta localizzazione nella membrana cellulare.

I farmaci attivi su questa classe di recettori possono avere come bersaglio il sito ortosterico, sito di legame per l'agonista naturale (ad esempio, la nicotina sul recettore nicotinico), oppure possono legarsi a siti allosterici (ad

esempio, le benzodiazepine sul recettore GABA_A). Infine, alcuni farmaci possono interferire con le proprietà biofisiche e funzionali del canale legandosi a siti posti nel lume del canale stesso (ad esempio, esametonio per il recettore nicotinico gangliare o barbiturici per il recettore gabaergico).

Accanto a questa classe di recettori-canale classica, esiste un'ulteriore grande famiglia di canali cationici la cui apertura è controllata da ligandi intracellulari, che sono stati chiamati TRP (*Transient Receptor Potential channels*). Essi hanno una struttura a sei regioni transmembrana molto simile a quella dei canali per il potassio, ma la loro apertura è attivata intracellularmente e direttamente da secondi messaggeri, quali il Ca²⁺, lo IP₂, il diacilglicerolo, l'anandamide (cannabinoide endogeno). Appartengono a questa famiglia anche i recettori per i vanilloidi e per la capsaicina, l'ingrediente irritante dei peperoncini; essi sono presenti soprattutto nei neuroni sensoriali del trigemino e nei gangli delle radici dorsali del midollo dove agiscono come identificatori primi degli stimoli nocivi di natura termica e chimica. Tuttavia la loro struttura molecolare e la (modesta) voltaggio-dipendenza li rendono più simili ai canali ionici voltaggio-dipendenti e in quel capitolo saranno descritti (vedi Capitolo 22).

Recettori accoppiati alle proteine G

L'attivazione dei recettori accoppiati alle proteine G induce la generazione di secondi messaggeri

È questa la famiglia recettoriale più numerosa, (circa 800 membri identificati e i loro geni costituiscono il 2% del genoma), e rappresenta il bersaglio della maggior parte dei farmaci utilizzati a scopi terapeutici. Numerosi sono i segnali extracellulari che attivano questi recettori; tra questi: fotoni, ioni, odoranti, nucleotidi, amine, lipidi, steroidi, amminoacidi, peptidi, chemochine, virus e ormoni glicoproteici. La caratteristica dei recettori accoppiati a proteina G (GPCR, *G Protein Coupled Receptor*) è di trasdurre il segnale generato dal legame con il mediatore attivando una proteina G (una famiglia di proteine eterotrimeriche composte da subunità α , β e γ , che legano GTP e posseggono attività GTPasica intrinseca).

I GPCR in relazione alla loro struttura molecolare, ai loro ligandi e alle G-proteine associate sono raggruppati in diverse famiglie. Essi sono formati da una singola catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica in corrispondenza di altrettante regioni idrofobiche e che si organizza spazialmente nella membrana in modo da costituire una particella globulare. Essi sono spesso chiamati in inglese *7TransMembrane Receptors* (7TMR) (Figura 6.2 e vedi Capitolo 13). Il sito di legame per il neurotrasmettitore si trova in una zona idrofila nelle porzioni transmembranarie o extracellulari della molecola. Il tratto di sequenza compresa tra la regione transmembrana 5 e 6, rivolta verso il citoplasma, è importante per il riconoscimento delle proteine G specifiche con cui ciascun recettore si accoppia; questo sito è quindi responsabile della specificità dell'effetto dell'attivazione recettoriale.

Quando un GPCR viene legato da un agonista, esso subisce una modificazione conformazionale che causa un aumento di affinità per una specifica proteina G e la sua attivazione. L'attivazione della proteina G comporta la captazione di una molecola di GTP da parte della subunità α e dissociazione del complesso trimerico. La subunità α e il complesso β/γ modulano l'attività di effettori, che possono essere enzimi (ad esempio, adenilato ciclasti e le fosfolipasi) o canali ionici. Lo stato di attivazione persiste finché, grazie all'attività GTPasica della subunità α , il GTP viene defosforilato a GDP e il complesso trimerico (inattivo) si riforma. A seguito della attivazione della proteina G possono aumentare nel citoplasma della cellula i livelli di secondi messaggeri, ad esempio: cAMP, cGMP, IP₂, Ca²⁺ (Figura 6.3).

Il termine *secondo messaggero* identifica sostanze o ioni (ad esempio, ione calcio) la cui concentrazione varia drasticamente e transitoriamente in risposta all'attivazione recettoriale e che sono in grado di legarsi a substrati specifici modificandone la funzione. Essi hanno la fun-

zione di localizzare il segnale all'interno della cellula e di amplificare il segnale recettoriale. Nello stato attivo, la proteina G può attivare più copie di effettori capaci di produrre numerose molecole di secondo messaggero. A sua volta il secondo messaggero può modulare la funzione di più effettori finali (prevalentemente chinasi) capaci di modificare la funzione di numerosi substrati. L'attivazione di un GPCR comporta quindi una reazione di eventi che procede a cascata amplificandosi in termini quantitativi (Figura 6.3). La durata degli effetti indotti dall'attivazione di questa classe di recettori può estendersi nel tempo indipendentemente dalla durata dell'interazione agonista-recettore ed essere anche dell'ordine di minuti; essa dipende soprattutto dall'efficienza di meccanismi cellulari specifici preposti alla riduzione della concentrazione del secondo messaggero e all'abolizione delle modificazioni post-traduzionali da esso indotte. I recettori accoppiati a G proteine possono formare dimeri, forse anche oligomeri, sia con recettori dello stesso tipo, omodimeri, sia con recettori di tipo diverso, eterodimeri

1° messaggio

2° messaggio

3° messaggio

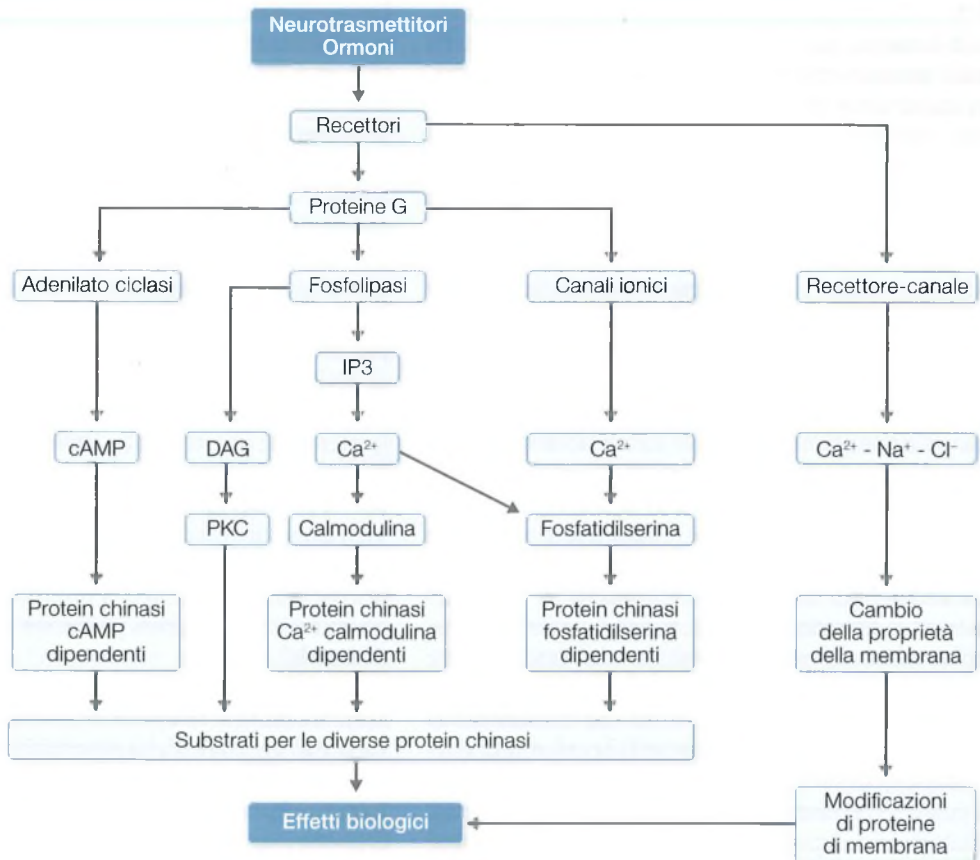


FIGURA 6.3 Cascata amplificante innescata dall'interazione tra un neurotrasmettitore e un suo recettore. Sono mostrati come esempi un recettore accoppiato a proteina G e un recettore-canale. L'interazione trasmettitore-recettore attiva proteine G specifiche (per semplicità nello schema ne è mostrata solo una) che, a loro volta, possono attivare più molecole enzimatiche, dette effettori (ad esempio, fosfolipasi o ciclasti). Ognuna di esse sintetizza o libera numerose molecole di secondi messaggeri (ad esempio, cAMP, IP₃, Ca²⁺) che a loro volta possono attivare numerose proteinchinasi. La fosforilazione di substrati specifici dà inizio alla reazione cellulare che sfocia nella risposta biologica. Questa cascata amplifica il segnale generato dall'interazione agonista-recettore; il suo sviluppo può essere controllato a ogni livello, sia positivamente che negativamente. Nel caso del recettore-canale, il messaggio è trasportato da una rapida entrata di ioni (milioni/msec) che a seconda dello ione coinvolto può produrre una cascata metabolica (Ca²⁺), o una depolarizzazione (Na⁺) o una iperpolarizzazione (Cl⁻) della membrana che comportano un cambiamento della polarità della membrana cellulare, che induce un cambiamento di conformazione di molte proteine di membrana (trasportatori e canali) responsabili dell'effetto biologico.

(vedi Capitolo 13). Ci sono sempre più evidenze che la forma funzionale di questi recettori sia quella dimerica. La formazione di dimeri garantisce il controllo di qualità da parte della cellula della corretta struttura del recettore nel processo di sintesi e garantisce il corretto traffico cellulare dei recettori e quindi anche la loro presenza alla membrana cellulare. Questi dimeri, specie gli eterodimeri, possono avere proprietà farmacologiche e meccanismi di trasduzione del segnale diversi dai recettori in forma monomeric. Essi possono essere tessuto-specifici e anche patologia-specifici, spiegando alcuni effetti strani e difficilmente comprensibili di alcuni farmaci. Questi aspetti contribuiscono a meglio capire il meccanismo della segnalazione intracellulare di questo tipo di recettori e il meccanismo d'azione dei farmaci attivi su di essi.

Recettori con attività chinasi intrinseca

La loro attivazione è stimolata dalla formazione di specifici complessi multiproteici, produce una attività chinasi intracellulare e modula sopravvivenza, differenziamento e proliferazione cellulare

È una famiglia molto numerosa di recettori attivati da ligandi generalmente proteici, tipicamente i fattori di crescita (insulina e IGF-1, NGF, EGF, FGF, ErbB, GDNF ecc.) e molte citochine (solo i recettori a tirosinchinasi sono più di 60 raggruppati in 20 famiglie). Essi sono costituiti da un'unica catena polipeptidica che attraversa una sola volta la membrana cellulare e sono caratterizzati dal fatto di possedere nella parte citoplasmatica un'attività chinasi selettiva su residui sia dello stesso recettore (autofosforilazione) che di numerosi altri substrati (Figura 6.2 e vedi Capitolo 14). I componenti di questa famiglia possono distinguersi per alcune peculiarità nell'organizzazione sopramolecolare e per l'attività chinasi che può avere come substrato la tirosina o la serina/treonina e sono spesso classificati in gruppi distinti. L'interazione ligando-recettore avviene a livello della porzione extracellulare della sequenza amminoacidica e porta alla dimerizzazione del recettore che è la tappa responsabile dell'attivazione della chinasi intrinseca. L'autofosforilazione di residui tirosinici o di serina/treonina presenti nella porzione citoplasmatica del recettore porta a una modificazione strutturale che favorisce l'associazione con specifiche proteine citoplasmatiche (adattatori) che consentono la formazione di complessi multiproteici la cui attività è responsabile degli eventi molecolari che inducono la cellula a sopravvivere, proliferare, muoversi o differenziarsi. Gli adattatori sono importanti perché la via di segnalazione a valle del recettore dipende dal tipo di adattatore e dalla sua particolare localizzazione nella cellula. Gli adattatori inoltre sono rilevanti nel regolare il traffico entro e fuori la membrana di questi recettori e il loro turnover. Molti oncogeni sono recettori per fattori di crescita che, a causa di mutazioni o delezioni di parte della proteina, hanno perso la regolazione fisiologica della loro attività.

I farmaci inibitori delle tirosinchinasi e gli anticorpi monoclonali specifici per i diversi recettori hanno aperto vie innovative e spesso assai promettenti per la terapia

selettiva di alcuni tumori e metastasi e per la regolazione delle risposte immuni (vedi Capitoli 14, 17 e 45).

Recettori con attività guanilato ciclasica

La loro attivazione produce il secondo messaggero cGMP localizzato in regioni sotto la membrana plasmatica

Sono recettori di tipo catalitico presenti sulla membrana cellulare che una volta attivati da ligando producono GMP ciclico (cGMP). Nei mammiferi sono state identificate diverse isoforme, ma solo di alcune è conosciuto il ligando specifico: questi sono il peptide natriuretico atriale (ANP), il peptide natriuretico del cervello (BNP), il peptide natriuretico intestinale (CNP) e una tossina stabile al calore di *Escherichia coli*, che sembra avere come controparte di ligando naturale la guanilina/uroguanilina.

Il recettore è localizzato sulla membrana cellulare ed è costituito da una singola catena amminoacidica; in essa si riconoscono un dominio extracellulare, che lega l'ormone, una zona idrofobica transmembrana e un dominio intracellulare dotato di attività guanilato ciclasica (Figura 6.2). Il dominio citoplasmatico possiede inoltre attività proteinchinasi che controlla l'aggregazione del recettore che consegue alla sua attivazione, l'efficienza e il riconoscimento del ligando. Quando il recettore viene attivato, esso sintetizza il secondo messaggero cGMP capace di regolare la funzione di numerosi effettori finali (prevalentemente chinasi). Nonostante siano relativamente poco rappresentati, essi modulano importanti funzioni a livello cardiovascolare e intestinale. Ad esempio, vi è una correlazione tra l'aumento dei livelli sierici di BNP e rischio di patologie cardiache, la distruzione del gene per il recettore per l'ANP produce negli animali ipertensione resistente alla deplezione di sodio, ipertrofia cardiaca, modifiche della matrice extracellulare e fibrosi cardiaca. Il recettore per il CNP è coinvolto nella secrezione dei fluidi intestinali e nella comunicazione tra intestino e rene per regolare il bilancio sodico. La distruzione del gene per il recettore del CNP protegge gli animali dalla diarrea provocata dall'enterotossina di *Escherichia coli*.

La modulazione farmacologica di questi recettori può avere un impatto terapeutico a livello di omeostasi pressoria e di controllo della diarrea da tossine batteriche.

Recettori per l'adesione cellulare

I recettori per l'adesione cellulare sono responsabili della interazione tra cellule e tra cellule e il microambiente ricco di informazioni plastiche e statiche

Essi trasducono i segnali che provengono da altre cellule e dalla matrice per regolare la crescita, la motilità, la forma delle cellule, il loro differenziamento e la loro esatta posizione nell'organismo sia in condizioni fisiologiche che patologiche (ad esempio, metastasi, malattie cardiovascolari, rigenerazione cutanea). Essi inoltre sono

importanti per la delimitazione di zone della cellula, vedi ad esempio la precisa delimitazione della zona sinaptica nelle sinapsi nervose e immunologiche. Tra le molecole di adesione cellulare (CAM) sono incluse numerose famiglie che hanno strutture e ligandi assai diversi. Tra le più importanti citiamo le integrine, le caderine, le selectine. Esse hanno funzione sia meccanica, di ancoraggio tra la cellula e il suo substrato, sia di trasduzione di segnali in seguito all'interazione ligando/recettore con l'attivazione di eventi biochimici complessi. Le integrine sono degli eterodimeri costituiti da subunità α e β associate; sono state descritte 18 α e 8 β subunità che possono formare 24 eterodimeri funzionali, con diverse affinità per i ligandi, caratteristici per i diversi tipi cellulari. Una caratteristica comune di questi recettori, così diversi per struttura e funzione, è che la loro attivazione comporta la formazione di complessi multiproteici (a cui partecipano spesso elementi del citoscheletro cellulare) capaci di reclutare trasduttori utilizzati anche da altre vie di segnalazione cellulare (vedi Capitolo 16). Ad esempio, sia le integrine che le CAM attivano tirosinchinasi (tra queste la più importante è la FAK, *Focal Adhesion-associated Kinase*); inoltre le CAM attivano anche vie associate a G proteine mentre le integrine attivano anche la cascata delle MAP chinasi. Inoltre questi recettori spesso cooperano con altri recettori (recettori per fattori di crescita, trombina ecc.) e canali ionici per un complesso e integrato processamento dei segnali extracellulari.

Sono stati prodotti molti farmaci che hanno per bersaglio le diverse integrine e che sono in avanzata fase di sperimentazione clinica; tra questi molti anticorpi monoclonali, peptidi e piccole molecole con attività antagonista e sviluppati soprattutto come agenti antitumorali o immunomodulanti (vedi Capitoli 28 e 45).

Recettori per le citochine

Numerosa famiglia di recettori che controllano la funzione delle cellule immunitarie ed ematopoietiche

Le citochine sono fattori di regolazione pleiotropici che controllano diverse funzioni, prevalentemente nei sistemi immunitario ed ematopoietico, tra cui proliferazione e differenziamento. Si distinguono diverse famiglie di recettori per le citochine in base alla struttura e ai sistemi di trasduzione del segnale, ma schematicamente essi possono essere ricondotti a due gruppi: i recettori di tipo 1, che legano molti fattori di crescita ematopoietici, il GH, la prolattina e molte interleuchine, e i recettori di tipo 2, che legano gli interferoni, le interleuchine 10 e 22 e il fattore VII della coagulazione (vedi Capitolo 15). I recettori di tipo 1 sono eterogenei in termini di struttura molecolare; sono composti da due o più subunità e sono suddivisi in sottogruppi in base alla presenza di una subunità comune responsabile della trasduzione del segnale (Figura 6.2). Ad esempio, i recettori per IL-3, IL-5, CM-CSF, che appartengono alla famiglia dei recettori per l'interleuchina 3, hanno ciascuno la subunità capace di riconoscere il proprio ligando, associata

alla subunità comune γ ; i componenti della famiglia dei recettori per l'interleuchina 6 hanno in comune la subunità GP130; quelli della famiglia dei recettori per la interleuchina 2 la subunità IL-2R α . La trasduzione del segnale, iniziata dal legame di una citochina, porta all'oligomerizzazione recettoriale omologa o eterologa alla quale segue l'attivazione delle chinasi JAK che attiva il fattore di trascrizione STAT. Allo stesso tempo, possono essere attivati degli adattatori che attivano poi le vie delle MAP chinasi e della PI3 chinasi. L'effetto finale di una data citochina dipende quindi dai tipi di recettore che recluta e dalle vie di segnalazione che attiva che possono essere differenti a seconda delle cellule e del loro stato funzionale. L'oligomerizzazione eterologa e la comunanza delle vie di trasduzione del segnale contribuiscono al pleiotropismo e alla promiscuità della risposta recettoriale tipica di questa classe di recettori. Può così avvenire che la stessa IL sia implicata nei fenomeni di immunità e di tolleranza.

I recettori di tipo 2 sono costituiti da due proteine transmembrana di struttura analoga ma tra loro distinte, caratterizzate nella regione extracellulare da tre domini *fibronectin-like* e da due domini *immunoglobulin-like*, che formano il sito di riconoscimento per i ligandi. La trasduzione del segnale avviene attraverso la dimerizzazione del recettore, provocata dal ligando, che porta ancora all'attivazione della via della JAK. Caratteristica di questa famiglia recettoriale è la produzione, mediante *splicing* alternativo o proteolisi, di recettori troncati, secreti o legati alla membrana, che legano il ligando ma non possono trasdurre il segnale; in questo modo si può avere una competizione per il ligando tra i due tipi di recettori e una ancor più controllata regolazione dell'effetto delle citochine.

Il controllo farmacologico di questi recettori può essere attuato sia a livello del sito di legame (agonisti e antagonisti) che a livello di trasduzione del segnale (sono state identificate proteine e peptidi che inibiscono selettivamente le chinasi JAK).

La farmacologia anti-citochine è molto recente e ha rivoluzionato il trattamento di molte patologie autoimmuni e infiammatorie. Essa si basa su anticorpi monoclonali contro le citochine o i loro recettori coinvolti nella regolazione della risposta immune, recettori solubili che funzionano da chelanti le citochine e piccole molecole dirette contro le vie chinasiche di trasduzione del segnale.

Recettori per TNF o recettori di morte

Recettori attivatori dell'apoptosi e dell'infiammazione

A questa famiglia recettoriale appartengono i recettori per il TNF α e il p75 *neurotrophin receptor*. Il TNF α è il principale mediatore dell'apoptosi, è implicato nel controllo dell'infiammazione e dell'immunità e nella patogenesi di molte malattie degenerative croniche. Anche il recettore p75 per le neurotrofine ha un ruolo nell'indurre apoptosi.

Questi recettori hanno una regione extracitoplasmatica

di circa 40 AA con uno o due domini ricchi di cisteine, una regione transmembrana e una citoplasmatica. Quest'ultima dopo l'attivazione da ligando può reclutare un dominio strutturale specifico detto *Death Domain* (DD, dominio di morte) capace di reclutare un complesso di segnalazione multiproteico (Figura 6.2). A seconda del DD reclutato si hanno funzioni diverse. Si riconoscono due tipi recettoriali: TNFR1, che recluta il DD TRADD (*TNF Receptor Associated DD*) che attraverso tappe successive arriva all'attivazione di NF κ B e media l'attività proinfiammatoria e immunostimolante. Il TNFR2 recluta il DD FADD (*Fas Associated DD*) che porta all'attivazione di caspasi 8 e 10 e all'attivazione del programma apoptotico. Le vie di trasduzione del segnale da parte dei due recettori hanno anche delle interazioni reciproche e l'effetto finale è il risultato dell'equilibrio tra queste due vie. Anche questa famiglia di recettori può dare origine a recettori troncati, secreti o legati alla membrana, che competono con i recettori interi per il ligando, regolando così ancora più finemente l'effetto finale del TNF (vedi Paragrafo Decoy receptors e Capitoli 15, 17 e 27). Sono stati sviluppati molti antagonisti di questi recettori, soprattutto anticorpi monoclonali, che agiscono sia come decoy receptors sia come bloccanti dei recettori di membrana; essi hanno contribuito a modificare sostanzialmente e in modo positivo la terapia di molte patologie infiammatorie gravi (vedi Capitoli 28 e 45).

Recettori "toll-like"

Recettori che riconoscono i microrganismi e regolano la risposta infiammatoria

I recettori toll sono una grande famiglia di recettori di membrana presenti in tutte le specie, dagli insetti all'uomo. Inizialmente identificati come regolatori dello sviluppo embrionale in drosophila, ne è stato in seguito riconosciuto lo stesso ruolo in altre specie. Essi riconoscono motivi molecolari complessi e molto conservati presenti in cellule eucariote e procariote e la loro attivazione porta a una cascata di eventi che culminano con la produzione di citochine e chemochine. Essi sono responsabili per l'attivazione dell'immunità innata, la prima forma di difesa contro i patogeni, e della risposta coordinata tra immunità innata e acquisita.

Sono costituiti da una sola catena peptidica, che attraversa la membrana una sola volta, caratterizzata nella parte esterna da numerosi motivi ricchi di leucina e nella parte citoplasmatica da siti di omologia con il recettore della IL-1 (Figura 6.2). Il sistema di trasduzione intracellulare del messaggio consiste essenzialmente nell'attivazione di NF κ B, attraverso una proteina adattatore, MyD88 (la stessa utilizzata dal recettore della IL-1), la chinasi IRAK e TRAF6. Essi possono anche attivare AP1 attraverso la cascata delle MAP kinasi, o indurre apoptosi, reclutando FADD e la caspasi 8. Le diverse vie di segnalazione dipendono dai recettori coinvolti e dalle cellule attivate. Nell'uomo sono stati descritti almeno 11 membri di questa famiglia di recettori che riconoscono specificamente diversi ligandi (ad esempio, TLR1 e TLR2: lipoproteine

batteriche e peptidoglicani, fibronectina; TLR4: LPS e batteri Gram negativi, la proteina di fusione del virus respiratorio sinciziale (RSV), taxolo; TLR5: flagellina batterica; TLR7 e 8: single strand RNA; TLR9: DNA batterico non metilato) (vedi Capitolo 47). I recettori 3,7,8,9 sono localizzati in endosomi, gli altri sono sulla membrana cellulare. L'espressione dei recettori da parte delle cellule e il riconoscimento dei ligandi è reso più efficiente e specifico dall'associazione con recettori per altre proteine di membrana. I recettori possono eterodimerizzarsi e modificare così l'affinità e lo spettro di selettività per i ligandi. Tutto questo comporta una grande plasticità nella risposta. I TLR sono espressi soprattutto nelle cellule deputate alla risposta immunitaria contro i microrganismi, come macrofagi, cellule presentanti gli antigeni, neutrofili, cellule endoteliali della cute, cellule del sistema digestivo e polmonare e linfociti B e T.

Da queste brevi notizie si può capire quanto essi siano importanti per il riconoscimento dei microrganismi da parte dell'organismo e per la modulazione della risposta immune antinfettiva. Sono già in sperimentazione clinica agonisti dei diversi recettori da utilizzare come adiuvanti nei vaccini, nelle infezioni da virus e batteri e come coadiuvanti nella terapia antitumorale. La preoccupazione maggiore è che una iperstimolazione del sistema immunitario porti a uno sviluppo di patologie autoimmuni. Gli antagonisti per i recettori 4,7-9 sono in fase di sviluppo clinico per le patologie autoimmuni con possibili buone prospettive, tenendo conto che la cloroquina, uno dei classici immunosoppressori, agisce bloccando i TLR.

Recettori per le lipoproteine

Recettori importanti per l'endocitosi e nella modulazione di diverse vie di trasduzione del segnale

Sono recettori capaci di riconoscere le lipoproteine e molti altri ligandi. A questa famiglia appartengono almeno 14 membri e le loro funzioni sono ancora molto da scoprire, ma quella più rilevante sembra essere correlata con l'endocitosi (essi sono chiamati, nella nuova nomenclatura, LDRR, VLDLR, LRP 1-12 suddivisi in 4 famiglie con strutture leggermente diverse).

I ligandi classici sono le diverse forme di lipoproteine e inoltre trenta ligandi con attività molto diverse (ad esempio, tPA, fattori 7, 8 e 9 della coagulazione, complemento, trombospondine, antitripsina, lattoferrina, rinovirus ecc.). Inoltre LRP 5 e 6 sono co-recettori per i ligandi Wnt stimolando la via di trasduzione del segnale Wnt- β -catenina, importante in molte patologie e possibile bersaglio di farmaci (vedi Capitolo 21). Questi recettori hanno una parte extracellulare molto estesa in cui sono presenti *Ligand Binding Repeats* (LBR), *EGF domains*, e altri domini non ben caratterizzati. La porzione citoplasmatica è caratterizzata dalla presenza di motivi che regolano il processo di internalizzazione e di altri domini capaci di interagire con molte proteine adattatrici. La funzione più nota di questi recettori è

collegata al metabolismo lipidico essendo direttamente responsabili dell'internalizzazione di lipoproteine e loro derivati contribuendo alla loro rimozione dal plasma e al trasporto all'interno delle cellule (vedi Capitolo 30); ma essi hanno anche una classica funzione recettoriale con proprio meccanismo di trasduzione del segnale in seguito al riconoscimento di molti ligandi. Ad esempio, l'attivazione da parte dell'attivatore del plasminogeno e di altre serin proteasi e metalloproteasi induce una cascata di eventi complessi che vanno dall'aumento del Ca^{+2} intracellulare, all'aumento di IP_3 , all'attivazione di ERK. Alcuni membri di questa famiglia di recettori hanno un ruolo nella modulazione della trasmissione sinaptica e dello sviluppo del sistema nervoso, probabilmente mediato dalla capacità di modulare il recettore NMDA del glutammato attraverso il legame con la proteina PSD95.

Decoy receptors

Recettori silenti che competono per il legame all'agonista

Alcuni recettori, tipicamente quelli delle citochine e di alcuni fattori di crescita, possono essere presenti anche in forma tronca priva del dominio intracellulare. Essi sono quindi incapaci di trasdurre il segnale, possono addirittura essere secreti ed entrare in competizione con i rispettivi recettori completi per il legame con l'agonista. In tal modo fungono da ulteriore sistema di regolazione funzionale di questi ultimi. Sono, quindi, un modo nuovo di regolazione fisiologica dell'attività recettoriale (vedi Capitolo 17). Si è sfruttata questa situazione utilizzando come farmaci alcuni di questi recettori solubili o molecole che ne mimino la funzione. Essi sono stati analizzati a fondo e hanno un impiego clinico per la regolazione del sistema immunitario/infiammatorio, ma non è escluso che questo tipo di controllo si verifichi e sia sfruttabile anche per altri sistemi recettoriali. Ad esempio, una delle forme più antiche di questa famiglia è la *Acetylcholine Binding Protein* (ABP) che viene secreta nelle sinapsi colinergiche di alcune lumache e contribuisce a modulare la sinapsi colinergica (vedi Capitoli 12 e 34).

Controllo della localizzazione dei recettori sulla membrana cellulare

Il recettore deve trovarsi nel posto giusto al momento giusto

L'espressione localizzata e controllata dei recettori nelle diverse cellule assicura la selettività tessutale e cellulare delle risposte a ligandi endogeni. Un ulteriore contributo al controllo delle risposte cellulari è assicurato dalla presenza di meccanismi che controllano la localizzazione e la distribuzione subcellulare dei recettori e di altre molecole importanti per la trasduzione del segnale, meccanismo questo fondamentale per garantire il numero e la corretta funzione soprattutto in strutture complesse come il neurone, la sinapsi neuronale e quella immunologica (vedi Capitolo 7, Figura 7.1, Capitolo 41, Figura 41.5 e Capitoli

32 e 45). Ad esempio, nella placca neuromuscolare il recettore colinergico nicotinico è localizzato in alta densità (10.000 molecole/ mm^2) all'apice delle pieghe della membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare. La particolare localizzazione è strategica in quanto pone il recettore proprio di fronte al sito di rilascio dal terminale presinaptico del neurotrasmettitore acetilcolina. Deficit della localizzazione subcellulare, in questo caso, comporterebbero una drastica riduzione dell'efficienza della trasmissione sinaptica dato che i recettori più distanti non potrebbero essere attivati in quanto l'acetilcolina viene rapidamente scissa dalle colinesterasi. L'alta densità recettoriale sulla membrana postsinaptica (associata alla presenza di analoghi meccanismi di controllo della localizzazione di canali voltaggio-dipendenti) assicura inoltre che le cariche ioniche che penetrano attraverso la membrana postsinaptica raggiungano un'alta concentrazione focalizzata tale da garantire la generazione di un potenziale di placca capace di propagarsi. In altre cellule, come i neuroni catecolaminergici del SNC, i recettori sono invece disposti lungo i dendriti e il corpo cellulare in modo da poter essere attivati da diverse terminazioni nervose e da neurotrasmettitori che diffondono anche per spazi non brevi dalla zona di rilascio (volume transmission). Ugualmente nelle cellule immunocompetenti vi è una diversa distribuzione dei recettori attivati dall'antigene, strettamente localizzati nella sinapsi immunologica, e quelli deputati al differenziamento e alla sopravvivenza, più diffusi sulla membrana cellulare. Il controllo della localizzazione è importante anche per permettere l'interazione con altre proteine essenziali alla trasduzione del segnale. Si è visto che in molti casi l'attivazione dei recettori comporta la formazione di complessi sopramolecolari. Perché il fenomeno sia efficiente, è necessario che le diverse proteine coinvolte siano tra loro molto vicine, immerse in un microambiente favorevole che garantisca da una parte una certa libertà di movimento e dall'altra impedisca la loro facile dispersione attraverso la diffusione. Spesso il complesso recettori-proteine adattatrici-trasduttori del segnale viene indicato con il nome di recettosoma. Un particolare ambiente favorevole ai meccanismi di trasduzione è rappresentato dai lipid rafts, sorta di zattere lipido-proteiche caratterizzate da un'alta concentrazione di colesterolo che possono formarsi e disperdersi su zone particolari della membrana; la loro localizzazione è dinamicamente controllata dal legame con il citoscheletro.

Come viene attuato e regolato il controllo della localizzazione? Per chiarirlo prendiamo in esame due tipi di recettori ionotropi per il glutammato: i recettori tipo AMPA e tipo NMDA. Questi recettori sono spesso localizzati nella stessa sinapsi dove lavorano di conserva e l'attivazione del tipo AMPA è essenziale per una successiva attivazione del tipo NMDA (vedi Capitolo 38). Si è potuto osservare che questi recettori interagiscono direttamente con altre proteine poste nella matrice subsinaptica – PSD95-SAP90, Shank e Homer – che contengono numerosi domini chiamati PDZ (dominio di circa 90 amminoacidi responsabile di molte interazioni proteina-proteina). Queste proteine

partecipano a formare una rete multiproteica che ancora tra loro recettori transmembranari, diversi elementi fondamentali per la trasduzione del segnale e componenti del citoscheletro. Una situazione simile si ha nelle sinapsi GABAergiche, dove i recettori per il GABA e per la glicina sono legati tra loro attraverso una maglia esagonale fatta dalla proteina gefirina, che garantisce l'aggancio con le proteine del citoscheletro (vedi Capitolo 32 e Figura 32.1). Questo complesso recettosoma e citoscheletro partecipa a realizzare il caratteristico aspetto submicroscopico dell'apparato postsinaptico delle sinapsi del sistema nervoso. Il legame tra recettori e matrice è plastico e può essere più o meno stabile a seconda della funzionalità cellulare, soprattutto nelle cellule nervose e nella parte postsinaptica. È possibile sperimentalmente dissociare questi complessi macromolecolari con grave disturbo della funzione recettoriale: 1. attraverso l'iniezione intracellulare di peptidi sintetici solubili contenenti domini PDZ; 2. con oligonucleotidi antisenso che inibiscono la sintesi di proteine contenenti questi motivi; 3. mediante composti, come la metil-ciclodestrina, che distrugge i rafts depletandoli di colesterolo (vedi **CD**: Approfondimento 6.2. *La regolazione della risposta recettoriale*, e Approfondimento 6.3. *Il traffico intracellulare dei recettori*).

Trasporto e traffico cellulare dei recettori

Come i recettori raggiungono la membrana cellulare e come ne è regolato il loro numero

I recettori sono sintetizzati nella cellula nel corpo cellulare o nelle zone subsinaptiche dei neuroni nel reticolo endoplasmatico; se sono costituiti da subunità, queste vengono assemblate nel reticolo e subiscono delle modificazioni post-traduzionali nell'apparato di Golgi. A livello degli organelli citati avviene il controllo di qualità, che lascia giungere alla superficie cellulare solo i recettori assemblati correttamente. In questi passaggi la molecola recettoriale che sta assemblandosi è normalmente protetta dalla degradazione dall'unione con una o più proteine della famiglia delle heat shock proteins. Infine i recettori maturi vengono trasportati alla membrana cellulare nei siti preposti.

Normalmente vengono sintetizzati più recettori di quanti la cellula ne abbisogni. I recettori in sovrannumero e quelli non assemblati correttamente vengono degradati dal sistema lisosomiale o della ubiquitina-proteasoma. Queste tappe, qui brevemente riassunte, sono molto complesse e regolate da numerose reazioni biochimiche sotto controllo fisiologico che si attivano o rallentano in funzione di variabili fisiologiche o patologiche (vedi **CD**: Approfondimento 6.3). Esse possono essere quindi anche bersaglio importante di farmaci. Due esempi: 1. la nicotina aumenta molto il numero di recettori nicotinici neuronali presenti sulla superficie cellulare intervenendo nel processo di assemblaggio e di maturazione dei recettori; 2. farmaci che diminuiscono l'attività del proteosoma hanno attività antitumorale e antinfiammatoria, e sono già in studio clinico.

Un aspetto particolare è quanto accade alla superficie cellulare. Se statisticamente, all'equilibrio, il numero di recettori è stabile in una data cellula o in parte di essa, questo equilibrio è raggiunto attraverso un dinamico rapporto tra i recettori inseriti e i recettori rimossi dalla superficie (turnover del recettore). Questo traffico alla membrana cellulare è regolato da farmaci e dalla funzione cellulare ed è responsabile di molte delle risposte ai farmaci e dell'attività cellulare. Basti pensare ai processi di desensitizzazione dei GPCR e alle modifiche del numero dei recettori glutammatergici nelle sinapsi eccitatorie dopo long term potentiation o long term depression (vedi **CD**: Approfondimenti 6.2, 6.3 e 38.1).

Modulazione delle risposte recettoriali

La desensitizzazione e la sensitizzazione della risposta recettoriale

La capacità delle cellule di rispondere a stimoli esterni è caratterizzata dal fatto che le risposte recettoriali sono controllate in termini quantitativi e temporali. Le strategie attuate per esercitare questo controllo sono molteplici e comprendono i meccanismi di sintesi, trasporto e rimozione dalla membrana plasmatica dei recettori (controllo del numero) e la regolazione della capacità del recettore e degli effettori di rispondere al mediatore. Alterazioni di questi controlli sono alla base di numerosi stati patologici. Esempi sono: 1. la miastenia grave (dovuta a riduzione del numero di molecole di recettore per l'acetilcolina presente sulla membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare); 2. la sindrome di femminizzazione testicolare (dovuta a mancanza genetica di recettori per gli androgeni); 3. alcune forme di diabete insulino-resistenti (dovute a riduzione del numero di recettori per l'ormone). In altri casi l'alterazione del numero di recettori è secondaria ad alterazione dei meccanismi che ne regolano l'espressione ed è responsabile di almeno parte della sintomatologia della malattia primaria (ad esempio, alcuni sintomi cardiovascolari che compaiono in corso di ipertiroidismo sono dovuti all'aumento di recettori β -adrenergici o di proteine G_s accoppiate all'adenilato ciclasi la cui espressione genica è positivamente controllata dagli ormoni tiroidei). Stati patologici che causano attivazioni prolungate di un sistema trasmettitoriale possono portare ad alterazioni del numero dei recettori e/o della capacità di trasdurre il segnale neurotrasmettitoriale. Un esempio tipico è rappresentato dal sistema adrenergico a livello cardiaco dove stati patologici che portano ad attivazione prolungata del sistema simpatico, come l'insufficienza cardiaca o l'infarto, inducono allo stesso tempo un aumento del numero dei recettori β -adrenergici nelle miocellule e una riduzione della capacità dei recettori stessi di trasdurre correttamente il segnale neurotrasmettitoriale (vedi **CD**: Approfondimento 6.2). Infine è ben noto il fenomeno dell'ipersensibilità da denervazione della fibra muscolare. La denervazione o l'inibizione cronica del rilascio di neurotrasmettitore (ad esempio, per avvelenamento da tossina botulinica)

provocano un aumento persistente e diffuso del numero di recettori nicotinici per l'acetilcolina sulla membrana della cellula muscolare. L'ipersensibilità da denervazione è un fenomeno caratteristico per le cellule che formano contatti sinaptici e, in minor misura, è presente anche in altri tessuti eccitabili, come i tessuti muscolari lisci e le ghiandole. È evidente il significato finalistico di questi fenomeni di adattamento delle risposte recettoriali: l'assenza di segnale induce la cellula ad aumentare il numero di recettori superficiali in modo da aumentare le probabilità di interazione con il trasmettitore e quindi di sentire il segnale; al contrario, l'eccesso di stimolazione viene tamponato attraverso una riduzione della capacità di risposta (vedi **CD**: Approfondimento 6.2).

Modulazione delle risposte recettoriali ai farmaci

In analogia con gli esempi "naturali" riportati sopra, la risposta recettoriale può essere modulata dalla durata e dall'intensità dell'esposizione a farmaci agonisti o antagonisti. Questo adattamento recettoriale alla stimolazione farmacologica è bidirezionale. Infatti il trattamento cronico con agonisti porta generalmente a una riduzione delle risposte recettoriali mentre il trattamento con farmaci antagonisti può indurre un aumento.

I meccanismi che sono alla base di questi fenomeni di adattamento al trattamento farmacologico vengono trattati in dettaglio nel **CD**: Approfondimento 6.2. Qui si fornisce una breve descrizione di questi fenomeni finalizzata soprattutto alla loro classificazione.

La riduzione delle risposte recettoriali dovuta a trattamento con agonisti viene detta refrattarietà o, con un termine "prestato" dall'inglese, desensitizzazione; questo fenomeno è la base cellulare e molecolare di alcuni di quei processi che portano alla tolleranza ai farmaci (vedi Capitolo 7).

La perdita della capacità di rispondere all'agonista può essere specifica per il recettore che è attivato: in questo caso si parla di desensitizzazione omologa. Spesso però l'attivazione prolungata di un sistema recettoriale induce desensitizzazione anche di altri recettori che utilizzano la stessa via di trasduzione del segnale o gli stessi effettori. Questo tipo di desensitizzazione crociata è detta desensitizzazione eterologa ed è un evento relativamente diffuso tra i recettori che sono accoppiati a proteine G. Essa può essere dovuta a modificazioni della molecola recettoriale o a modulazione dell'attività di proteine G e di sistemi effettori (ciclasasi, fosfolipasi, canali ionici ecc.) comuni a più recettori.

In linea teorica, la desensitizzazione può avvenire a

qualsiasi livello: riduzione dell'affinità, incapacità di trasdurre il segnale, riduzione del numero di molecole recettoriali. L'ultimo meccanismo viene più comunemente detto *down regulation* (regolazione verso il basso, riduzione). Ciascun recettore può andare incontro a desensitizzazione con modalità proprie, talvolta comuni e spesso diverse da quelle utilizzate da altri recettori anche nella stessa cellula; inoltre, l'entità della desensitizzazione può differire, per uno stesso recettore, tra tessuti diversi. Nonostante la varietà, è possibile riconoscere meccanismi e strategie comuni di desensitizzazione all'interno di alcune delle grandi superfamiglie recettoriali (vedi **CD**: Approfondimento 6.2).

In particolare, per i recettori-canale il fenomeno della desensitizzazione si esplica prevalentemente attraverso la perdita della capacità di regolare lo stato d'apertura del canale ionico (evento spesso rapido e dall'altrettanto rapido recupero). Benché per questi recettori la desensitizzazione sia una proprietà intrinseca della molecola e in parte legata alla loro sequenza amminoacidica, la velocità del processo di desensitizzazione può essere modulata da fosforilazioni del recettore stesso.

Per i recettori GPCR si riscontrano sia alterazioni dell'affinità (riduzione della capacità di legare l'agonista) che della capacità di trasdurre il segnale (ridotta capacità di attivare la proteina G, disaccoppiamento); a questi due eventi (che in genere insorgono rapidamente) spesso segue anche un aumento della velocità di rimozione del recettore dalla membrana (internalizzazione) a cui consegue una riduzione significativa del numero di recettori espressi in superficie (*down-regulation*). Questi fenomeni sono legati a processi di fosforilazione recettoriali spesso mediati da specifiche chinasi e che comportano la formazione di complessi macromolecolari specifici che mediano sia l'internalizzazione che il disaccoppiamento.

Per i recettori per i fattori di crescita (recettori ad attività tirosinchinasica) il fenomeno dell'internalizzazione, a cui consegue *down-regulation*, fa parte intrinseca del meccanismo di attivazione del recettore stesso.

Il fenomeno opposto alla desensitizzazione è definito *sensitizzazione ai farmaci* o, più comunemente, *up-regulation*. Nella maggior parte dei casi, la *up-regulation* è legata a un aumento dell'espressione genica del recettore. L'aumento del numero di recettori che viene indotto dal trattamento cronico con un antagonista comporta un'aumentata sensibilità al neurotrasmettitore endogeno quando la terapia con l'antagonista viene sospesa. Poiché il "riadattamento" della cellula alla situazione originaria richiede tempo, è prassi terapeutica procedere a una sospensione graduale del trattamento quando la terapia è attuata in modo cronico con antagonisti.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ La maggior parte delle comunicazioni tra cellule, sia tra cellule contigue che tra cellule lontane tra loro, avviene attraverso un sistema di messengeri (ioni, neurotrasmettitori, peptidi, ormoni, lipidi ecc.) rilasciati da una cellula e riconosciuti da un'altra cellula attraverso molecole particolari chiamate recettori.
- ▶ I recettori per trasmettitori endogeni possono essere raggruppati in base alla struttura molecolare.
- ▶ I membri di una stessa famiglia di recettori hanno strategia di trasduzione del segnale simile.
- ▶ I recettori sono modulabili nella loro risposta sia nello spazio che nel tempo.
- ▶ La maggior parte dei farmaci agisce legandosi e inattivando/attivando uno o più recettori.
- ▶ Si può agire sui sistemi recettoriali con i farmaci anche interferendo con le vie di trasduzione del segnale intracellulare o modificando il traffico, la localizzazione e il numero dei recettori alla membrana cellulare.

Bibliografia essenziale

- ▶ Nuclear receptors. *Br J Pharmacol* 2009;158:S157-S167. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00485.
- ▶ 7TM Receptors. *Br J Pharmacol* 2009;158:S5-S101. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00501.
- ▶ LGIC. *Br J Pharmacol* 2009;158:S103-S121. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00502.
- ▶ Catalytic receptors. *Br J Pharmacol* 2009;158:S169-S181. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00504.
- ▶ Angers S, Moon RT. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:468-77.
- ▶ Ben-Shlomo I, Hsu SY, Rauch R et al. Signaling Receptome: a genomic and evolutionary perspective of plasma membrane receptors involved in signal transduction *Sci STKE* 2003;RE9.
- ▶ Changeux JP, Edelstein SJ. Allosteric Receptors after 30 years. *Neuron* 1998;27:959-80.
- ▶ Garbers DL, Chrisman TD, Wiegand P, Katafuchi T et al. Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:251-8.
- ▶ Gemain P, Staels B, Dacquet C et al. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:685-704.
- ▶ Groves JT, Kuriyan. Molecular mechanisms in signal transduction at the membrane. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:659-65.
- ▶ Haugh JM. Localisation of receptor-mediated signal transduction pathways: The inside story. *Mol Interv* 2002;2:293-307.
- ▶ Lagerström MC, Schiöth HB. Structural diversity of Gprotein-coupled receptors and significance for drug discovery *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:339-57.
- ▶ Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* 2010;16:133-43.
- ▶ Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117-34.
- ▶ Lodge D. The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature. *Neuropharmacology* 2009;56:6-21.
- ▶ Millar NS, Gotti C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors *Neuropharmacology* 2009;56:237-46.
- ▶ Parkinson T. The future of toll-like receptors therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 2008;10:21-31.
- ▶ Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:639-49.
- ▶ Rozenfeld R, Devi LA. Receptor heteromerization and drug discovery. *TIPS* 2010;31:124-30.
- ▶ Schwarz M, Wells T. New therapeutics that modulate chemokine networks. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:347-58.
- ▶ Wilson NS, Dixit V, Ashkenazi A. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol* 2009;10:348-55.
- ▶ Zuany-Amorim C, Hastewell J, Walker Ch. Toll-like receptors as potential targets for multiple diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:797-807.

Adattamento della risposta alle sostanze e tossicodipendenza

CAPITOLO

7

Cristiano Chiamulera

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le definizioni del fenomeno dell'adattamento della risposta alle sostanze, e in particolare di quelle note per indurre tossicodipendenza, come analogia con le altre forme di plasticità
- ▶ Conoscere e apprendere i meccanismi molecolari, cellulari e sistemici come correlati meccanicistici dei fenomeni (ad esempio, la tolleranza) e dei sintomi (ad esempio, la ricaduta compulsiva) associati alla tossicodipendenza
- ▶ Conoscere le più recenti scoperte che hanno permesso avanzamenti conoscitivi in ricerca e applicativi in clinica
- ▶ Approfondire i concetti di riferimento psicologico e clinico della tossicodipendenza, le conoscenze sulle principali sostanze d'abuso, sui loro meccanismi d'azione e sui farmaci usati nella terapia di disassuefazione

Definizione dei concetti di adattamento, allostasi e omeostasi

L'adattamento è una caratteristica peculiare del mondo biologico. È la proprietà che permette ai sistemi biologici di adattarsi all'ambiente; ambiente definito in senso ampio come l'insieme degli stimoli esterni e interni ai quali è esposto un organismo nel corso della sua esistenza.

Adattamento è quindi l'insieme di eventi che nel corso di tutta la vita, incluso il periodo prenatale, permette lo sviluppo e il mantenimento dell'organismo quando esposto a condizioni mutevoli. Ciò è possibile perché l'organismo ha sviluppato meccanismi in grado di mettere in atto delle risposte compensative che si instaurano a vari livelli. L'adattamento è parte integrante della filogenesi e della fisiologia dell'organismo adulto, ma acquista particolare interesse di studio e di intervento terapeutico quando è dovuto all'esposizione a fattori ambientali anormali o patologici, come ad esempio stress cronico, infezioni, sostanze, tossine o alimenti. In questo caso l'adattamento, se è in grado di raggiungere dinamicamente un nuovo stato di equilibrio, si definisce allostasi (*allos*: diverso, invece di *omoios*: simile).

Allostasi è il processo tramite il quale l'organismo mantiene stabilità fisiologica modificando i suoi parametri interni in accordo appropriato alle esigenze ambientali. Mentre l'omeostasi è lo stato in cui tutti i parametri fi-

siologici operano entro valori normali, l'allostasi è uno stato dinamico di risposta e fluttuazione finalizzato all'adattamento a condizioni mutevoli.

Tra tutti i sistemi, il sistema nervoso centrale (SNC) è quello che presenta il più alto grado di adattamento. L'adattamento neurale, o neuroplasticità, si manifesta sotto forma di modifiche morfologiche e funzionali a livello molecolare, cellulare e dei circuiti neuronali. Caratterizza lo sviluppo morfologico e funzionale del sistema nervoso e, nell'età adulta, l'apprendimento, la memoria, la capacità di recupero, le risposte ai farmaci e alle sostanze.

In genere, si tende a definire un processo di adattamento in base alla sua persistenza nel tempo, e alla tipologia di condizione mutevole che lo ha indotto. Quest'ultimo può includere un'ampia gamma di stimoli sensoriali, nutritivi, patologici e farmacologici. La ricerca nelle Neuroscienze ha dimostrato come la maggior parte delle "esperienze" di un individuo permette l'attivazione e il mantenimento di fenomeni di neuroplasticità: imparare a pettinarsi in modo automatico, la conoscenza di una lingua, il riconoscimento di espressioni facciali. La scoperta di meccanismi comuni alla base della neuroplasticità ha così ampliato il concetto di "memoria", non più ristretto al ricordare esperienze, nomi e concetti (la cosiddetta memoria dichiarativa), ma anche comprensivo dell'apprendere automatico di movimenti, informazioni o, più in generale, l'apprendere stimoli – inclusi quelli

farmacologici – che afferiscono al corpo e al suo organo di relazione con l'ambiente, il cervello (vedi **CD**: Approfondimento 7.1. *Una definizione moderna di memoria*).

Anche la ripetuta stimolazione farmacologica a livello recettoriale può fungere da stimolo induttore di adattamento, rispettivamente molecolare, cellulare e sistemico. L'esposizione ripetuta a una sostanza può causare tossicodipendenza. La tossicodipendenza è la perdita di controllo dell'uso di una sostanza, ovvero è la ricerca e l'assunzione compulsiva di questa a dispetto delle conseguenze avverse. La tossicodipendenza può durare per anni a causa di un alto rischio di ricaduta, suggerendo che essa coinvolga modificazioni stabili nel cervello. Quindi, per comprendere e trattare la tossicodipendenza è importante conoscere gli effetti molecolari e cellulari delle sostanze d'abuso e come questi effetti inducano modifiche persistenti nel cervello.

Questo capitolo affronta il fenomeno dell'adattamento della risposta alle sostanze, e in particolare di quelle note per indurre tossicodipendenza, le cosiddette sostanze d'abuso. L'analogia con le altre forme di plasticità cerebrale, come i vari tipi di memoria, ha permesso negli ultimi anni di definire un paradigma comune. L'identificazione di meccanismi molecolari, cellulari e sistemici comuni ha fornito correlati – e quindi costrutti meccanicistici – dei fenomeni (ad esempio, la tolleranza) e dei sintomi (ad esempio, la ricaduta compulsiva) associati alla tossicodipendenza. Tali conoscenze si sono sviluppate in concomitanza con avanzamenti tecnologici (ad esempio, la visualizzazione cerebrale) che hanno permesso avanzamenti conoscitivi in ricerca, e applicativi in clinica.

L'adattamento molecolare, cellulare e sistemico

Tutte le cellule presentano delle strutture atte a ricevere informazioni dalle cellule e dallo spazio extracellulare adiacente. Il neurone riceve stimoli da altri neuroni tramite le connessioni sinaptiche. Il neurone può ricevere stimoli afferenti tramite la trasmissione neurochimica (neurotrasmettitori endogeni), oppure tramite sostanze esogene che arrivano dal circolo sanguigno (come farmaci e droghe). La risposta biologica si innesca quando il legame recettoriale e la trasduzione del segnale portano alla cascata di eventi caratterizzanti. Quando lo stimolo, cioè i ligandi neurotrasmettitoriali o farmacologici, si presenta in modo anomalo, si può indurre neuroplasticità sinaptica. Questi modi anomali possono essere:

- ▶ minore o maggiore concentrazione sinaptica del ligando;
- ▶ minore o maggiore durata temporale della presenza del ligando a livello sinaptico;
- ▶ aumentata frequenza di stimolazione, ad esempio per trattamenti ripetuti nel tempo.

Queste anomalie inducono delle risposte adattative acute o croniche. Mentre le prime rientrano nelle caratteristiche

fenotipiche di recettori ed enzimi (ad esempio, la rapida desensibilizzazione di recettori a canale ionico), le seconde sono caratterizzate da risposte biologiche modificate che si possono protrarre nel tempo.

Il neuroadattamento può essere descritto in due forme diverse. La prima forma, definita neuroplasticità transiente, implica le modifiche neuronali e sinaptiche della durata dalle ore alle settimane. La seconda forma, la neuroplasticità stabile, persiste per settimane fino a modifiche permanenti.

Prima di descrivere i principali livelli di adattamento di un neurone, è utile ricordare l'analogia con la rappresentazione tradizionale di memoria. L'apprendimento e il ricordo di una parola sentita più volte corrispondono all'adattamento di circuiti neuronali esposti alla stessa stimolazione (la parola) ripetuta più volte. Il ricordo di quella parola corrisponde quindi a modifiche persistenti di funzioni sinaptiche e neuronali. Analogamente accade nell'esposizione ripetuta a un farmaco o a una droga. Questa moderna definizione cellulare di memoria, ora estesa anche agli stimoli farmacologici, permette di identificare meccanismi molecolari comuni che sottostanno alla base delle diverse forme di neuroplasticità (vedi **CD**: Approfondimento 7.1).

L'adattamento cellulare

Le risposte neuroadattative all'esposizione cronica ai farmaci e alle sostanze d'abuso possono avvenire a livello di:

- ▶ conformazione e stato allosterico recettoriale;
- ▶ cascata dei secondi messaggeri e dei livelli di calcio intracellulare;
- ▶ proteinchinasi;
- ▶ fattori di trascrizione e regolazione dell'espressione genica.

La regolazione dell'espressione genica è uno dei meccanismi più studiati di adattamento cellulare e può portare a cambiamenti stabili nel neurone. Modifiche delle funzioni nucleari e alterazioni dei fattori di trascrizione per determinati geni target possono causare perturbazione delle vie di trasduzione intracellulare. L'alterata espressione di questi geni porta alla modifica della funzionalità del neurone, dei corrispondenti circuiti neuronali e processi psico-comportamentali. Un numero limitato di fattori di trascrizione sembra giocare un ruolo fondamentale nel mediare l'adattamento da farmaci e droghe.

È stato dimostrato che esistono anche cambiamenti a livello post-traduzionale dei livelli di proteina in una cellula. Si è visto che le droghe possono indurre alterazioni della traslazione dell'mRNA, della degradazione proteica e del targeting corretto di una proteina nella cellula.

L'adattamento sia nella fase di apprendimento che nella fase di consolidazione sfrutta meccanismi fisiologici che abbiamo visto comuni al processo di memorizzazione, ad esempio, dei ricordi. Il nuovo equilibrio allostatico rimane tuttavia tale fintanto che persiste l'esposizione alla stimolazione protratta al segnale neurotrasmettitoriale e farmacologico. Quando questo viene a mancare – ad

esempio con la cessazione brusca e l'astinenza – l'equilibrio allostatico si manifesta come squilibrio e quindi come disturbo.

Effetti dell'esposizione ripetuta alle sostanze

Molti trattamenti farmacologici richiedono un regime posologico che prevede più di una singola somministrazione acuta di farmaco. Le ragioni possono essere diverse e ascrivibili al profilo farmacocinetico e farmacodinamico, oppure dipendere dallo sviluppo temporale e dalle eventuali recidive della patologia sotto trattamento.

Dal punto di vista farmacocinetico, un trattamento ripetuto (diverse somministrazioni di un singolo dosaggio, ad esempio più pillole al giorno) o costante (unica somministrazione protratta, ad esempio una formulazione a lento rilascio) garantisce il raggiungimento e il mantenimento dei livelli plasmatici del farmaco entro cui si osserva l'effetto terapeutico. Il razionale posologico può essere basato sulle proprietà farmacodinamiche del farmaco e sulla loro modulazione nel tempo, oppure sull'osservazione clinica della remissione dei sintomi.

Un tipico esempio noto da anni è che la comparsa dell'efficacia clinica degli antidepressivi nella remissione dei sintomi della depressione maggiore richiede almeno 3-4 settimane di trattamento. La conoscenza del meccanismo d'azione di alcuni di questi farmaci – l'aumento dei livelli sinaptici delle monoamine – non è in grado di spiegare questa lenta insorgenza dell'effetto clinico. Studi recenti hanno suggerito che probabilmente l'efficacia di questi farmaci derivi dalla ripetuta stimolazione dei livelli di monoamine, i quali a loro volta indurrebbero modifiche a livello di espressione genica in alcuni circuiti neuronali coinvolti nella regolazione dell'umore.

Importante è definire il termine "trattamento cronico" come trattamento farmacologico di durata protratta nel tempo, che non implica tuttavia la costanza dei livelli plasmatici. Gli effetti cronici di un trattamento farmacologico o di una sostanza d'abuso si possono osservare anche con una ripetizione della somministrazione che sia solo una volta al giorno, o anche alla settimana. Ciò che è invece importante è per quanto tempo si protrae tale uso del farmaco o della sostanza d'abuso.

Questo è particolarmente rilevante nelle tossicodipendenze, dove ad esempio la dipendenza all'ecstasy o all'alcol si possono instaurare anche con assunzioni limitate al week-end.

Come l'esposizione cronica ai farmaci può indurre delle modifiche adattative necessarie per la comparsa dell'efficacia clinica desiderata, analogamente la cronicità del trattamento farmacologico – o più in generale dell'assunzione di sostanze ad azione biologica sull'organismo – può indurre una serie di effetti indesiderati o tossici. Questi includono la ridotta o assente risposta clinica e la comparsa di eventi avversi e tossici.

I fenomeni dovuti all'esposizione cronica ai farmaci sono la tolleranza, la sensibilizzazione (o tolleranza inversa). I

fenomeni associati all'interruzione dell'esposizione cronica sono le sindromi d'astinenza (o cessazione brusca) fisica e psicologica.

Tolleranza

La tolleranza è quell'insieme di fenomeni ascrivibili alla riduzione o alla perdita della risposta biologica indotta dal farmaco, ovviamente quando sia dimostrato che tale riduzione non sia dovuta all'esacerbazione della patologia sotto trattamento. La tolleranza a un farmaco corrisponde alla graduale perdita dell'efficacia terapeutica dopo somministrazioni ripetute, ma che si può tuttavia ristabilire aumentandone il dosaggio.

Il problema principale della tolleranza farmacologica è che non è necessariamente presente per tutti gli effetti biologici indotti dal singolo farmaco. Può essere talvolta assente per alcuni effetti indesiderati o tossici. L'aumento della dose per contrastare l'insorgenza della tolleranza può quindi comportare il raggiungimento di livelli plasmatici in grado di indurre altri effetti, quelli che non vanno incontro a tolleranza e che possono essere indesiderati, tossici o addirittura letali.

A livello funzionale, viene concettualizzata come una risposta adattativa uguale e contraria messa in atto dall'organismo. Il primo livello a cui si manifesta la tolleranza è quello relativo all'attivazione e alla trasduzione recettoriale attraverso il quale si instaura l'effetto farmacologico, e quindi a cascata con ripercussioni a livello cellulare e sistemico. Ad esempio, uno dei meccanismi biologici che sottendono la tolleranza agli oppiacei è la down-regulation dei recettori per gli oppioidi. Altri meccanismi comprendono: a) ridotta attività sinaptica; b) ridotto numero di bottoni sinaptici; c) ridotta sintesi di neurotrasmettitore; d) riduzione dei meccanismi di trasporto e localizzazione dei recettori.

In definitiva, il circuito neuronale presenta una funzione neurochimica ridotta in risposta al trattamento farmacologico quando questo è stato applicato in una modalità di trattamento cronico.

Sensibilizzazione

La sensibilizzazione è stata per molto tempo definita come tolleranza inversa, ovvero come aumentata risposta biologica al trattamento cronico con una sostanza. La concettualizzazione del fenomeno della sensibilizzazione non è intuitiva, in quanto si suppone che l'organismo metta in atto risposte adattative contrarie all'azione del farmaco, e non additive o sinergiche. Mentre la tolleranza è un meccanismo adattativo di tipo "difensivo", la sensibilizzazione sposta la regolazione della risposta biologica verso una forma allostatica di "ipersensibilità".

Anche se fisiologicamente l'aumento della risposta biologica corrisponde a un miglioramento della funzione – ad esempio l'ipersensibilità a uno stimolo tattile potenzialmente dolorifico permette di anticiparne la percezione e quindi l'evitamento – nel caso della sensibilizzazione farmacologica può comportare dei rischi di tossicità. La

sensibilizzazione è un fenomeno che solo negli ultimi anni è stato proposto come una delle caratteristiche principali della dipendenza psicologica alle sostanze d'abuso, in particolar modo agli psicostimolanti. Analogamente alla tolleranza, la sensibilizzazione si manifesta a vari livelli di complessità biologica, dai recettori alla regolazione dell'espressione genica, dalla modifica morfologica dei neuroni all'aumento di varie risposte psico-comportamentali.

Il trattamento cronico con amfetamina, cocaina, nicotina e altre sostanze d'abuso in cavie da laboratorio induce un aumento dei processi neuronali e del numero di sinapsi. È importante sottolineare come anche la sensibilizzazione sia una forma di adattamento allostatico che si instaura e si mantiene come memoria, cellulare e sistemica, che può essere "richiamata" anche dopo molto tempo. La ricerca psicofarmacologica ha individuato meccanismi neuronali alla base della sensibilizzazione, che si possono sinteticamente descrivere come una serie di eventi di ipersensibilità neurochimica che si instaura e che permane nel tempo, anche dopo la completa disassuefazione, similmente alle varie forme di memoria.

È noto come gli ex-alcolisti debbano astenersi dall'assumere quelle sostanze che contengono quantitativi anche minimi di alcol per evitare effetti euforici che possano portare alla ricaduta. Questo rischio, ampiamente noto, è stato studiato anche dal punto di vista neurochimico. È stato osservato che diverse tipi di recettori, come quelli per il glutammato sottotipo NMDA, aumentano di numero dopo esposizione cronica all'etanolo e tale up-regulation recettoriale media la capacità di basse concentrazioni di etanolo di stimolare i processi di ricerca e assunzione della bevanda alcolica.

La risposta di sensibilizzazione si manifesta quindi come una risposta farmacologica che si può ottenere con dosaggi bassi, gli stessi che originariamente, prima dell'esposizione protratta, non avrebbero indotto alcun effetto farmacologico.

Sindrome da cessazione e crisi d'astinenza fisica e psicologica

Per molte classi di farmaci, in particolare quelle per il trattamento dei disturbi del SNC, sono state descritte delle sindromi dovute all'interruzione del trattamento. Generalmente tali sindromi – diverse da classe a classe – si osservano quando il trattamento si protrae da un certo tempo, e quando viene interrotto bruscamente. La caratteristica comune è la ricomparsa dei sintomi della patologia sotto trattamento con una gravità uguale, oppure addirittura maggiore, fenomeno questo definito rebound effect (effetto sponda). Sono stati descritti ad esempio rebound di ansia, insonnia, ipertensione.

Recentemente sono state descritte sindromi complesse da cessazione degli antidepressivi inibitori della ricaptazione della serotonina (SSRI, *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*). Il quadro della cessazione brusca da SSRI è complesso e si manifesta anche in casi di sola riduzione

del dosaggio del farmaco. Si è visto che la gravità della sindrome è correlata ai tempi di dimezzamento dei livelli plasmatici dei vari farmaci SSRI. Il rispetto delle indicazioni sulle modalità d'uso degli SSRI (durata e dosaggio del trattamento), così come della loro interruzione (riduzione graduale del dosaggio) permette di ridurre i rischi della comparsa della sindrome da cessazione brusca.

Nonostante le attuali divergenze sul riconoscimento diagnostico della sindrome da cessazione brusca, i dati disponibili sembrano escludere che il fenomeno sia associabile all'esistenza di una dipendenza fisica o psicologica al farmaco. Come si vedrà in seguito, la diagnosi dello stato di dipendenza da sostanze deve soddisfare una serie di criteri diagnostici necessari. La presenza di dipendenza fisica non è un criterio sufficiente e necessario, anche se è incluso nel quadro diagnostico di alcune forme di tossicodipendenza.

I meccanismi molecolari, cellulari e sistemici alla base delle sindromi da cessazione e delle crisi d'astinenza fisica e psicologica sono tutti ascrivibili allo smascheramento di un adattamento il quale – fintanto che il farmaco è presente nel corpo – non è manifesto.

Le crisi d'astinenza sono dei quadri sintomatici che, con entità variabili, si osservano alla cessazione di quasi tutte le sostanze d'abuso. La sintomatologia può essere sia fisica che psicologica, con differenze da droga a droga. In genere, queste forme di adattamento si manifestano all'astinenza dalla sostanza con effetti contrari a quelli desiderati con il trattamento (eccitazione dopo protratto trattamento sedativo), oppure con la ricomparsa dei sintomi sotto trattamento (insonnia dopo trattamento prolungato con sonniferi benzodiazepinici).

Ad esempio, l'astinenza dell'oppiaceo ipnotico-sedativo eroina induce una crisi d'astinenza fisica caratterizzata da una eccitazione generalizzata. Al contrario, la cessazione dello psicostimolante cocaina si manifesta con una sindrome di tipo psicologico con alterazioni dell'umore e dell'affettività. L'astinenza da nicotina presenta ambedue le classi sintomatologiche, dove curiosamente il principale sintomo fisico è l'aumento di peso. Nonostante l'evidente differenza di gravità clinica della sintomatologia fisica di eroina e nicotina – ad esempio crampi e dolore nella prima ma non nella seconda – sono entrambe condizioni cliniche che possono portare alla ricaduta all'assunzione della sostanza, ad esempio contrastare il dolore negli eroinomani e per controllare il peso nei fumatori.

La tossicodipendenza come paradigma di adattamento allostatico

I diversi fenomeni di adattamento dell'organismo alla risposta biologica indotta dai farmaci trovano una rappresentazione paradigmatica nella tossicodipendenza. La tossicodipendenza è un disturbo del comportamento dovuto all'assunzione cronica di sostanze d'abuso. Il termine comune di droghe si applica a tutte quelle sostanze (ad esempio bevande alcoliche, oppio ecc.) che contengono uno o più molecole chimiche ad azione psicoattiva e in

grado di indurre dipendenza (rispettivamente etanolo, morfina ecc.), definite sostanze d'abuso (Tabella 7.1 e vedi

CD: Approfondimento 7.2. *Il condizionamento come processo psicologico alla base della tossicodipendenza*).

Una sostanza d'abuso induce dipendenza se possiede proprietà di rinforzo, ovvero esercita effetti piacevoli in grado di aumentare la probabilità che l'assunzione si ripeta in seguito. Questa è la caratteristica farmacologica che porta all'induzione e al mantenimento del comportamento tossicodipendente. Quando una sostanza agisce da rinforzo, significa che induce e mantiene un condizionamento operante (detto anche strumentale). Il condizionamento operante è il processo di apprendimento che garantisce la ripetizione di quei comportamenti che portano al conseguimento di piaceri naturali, come il corteggiamento, l'approccio, la ricerca del cibo e dei liquidi. Quindi le sostanze d'abuso che agiscono da rinforzo utilizzano dei meccanismi fisiologici alla base dei comportamenti motivati. La differenza risiede nel fatto che mentre i rinforzi naturali lo fanno agendo su meccanismi cerebrali in modo fisiologico, le sostanze d'abuso inducono invece effetti così potenti da indurre neuroadattamento quando l'esposizione è cronica (vedi

CD: Approfondimento 7.2).

La diagnosi di tossicodipendenza deve soddisfare dei criteri necessari come: a) la presenza nella droga di una sostanza con proprietà di rinforzo; b) l'instaurarsi di un comportamento di assunzione; c) il riconoscimento di una sintomatologia d'astinenza. Questi criteri principali definiscono il quadro generale di dipendenza psicologica da sostanza d'abuso, criterio necessario e sufficiente. Il tossicodipendente è psicologicamente dipendente dalla sostanza perché necessita e desidera continuare a provare gli effetti piacevoli indotti dalla sostanza rinforzante in essa contenuta. Il tossicodipendente può inoltre avere bisogno di assumere la sostanza per contrastare gli effetti avversi a livello fisico dell'astinenza dalla stessa. Questo criterio è osservato solo per alcune forme di tossicodipendenza – come quelle per oppiacei e alcol – e non è quindi un criterio sufficiente. Altro criterio utilizzato in

passato per definire la tossicodipendenza da una sostanza era il fenomeno della tolleranza. Tuttavia, non tutte le sostanze inducono tolleranza. A partire dalla fine degli anni 80 del XX secolo, la definizione di tossicodipendenza si andata allargando inglobando fenomeni e sintomi riportati dai tossicodipendenti e osservati clinicamente. Alcuni di questi, come il *craving* (forte desiderio soggettivo di assumere la sostanza) e la *cue reactivity* (ipersensibilità a stimoli ambientali precedentemente associati alla droga), hanno evidenziato che la tossicodipendenza colpisce dimensioni psicologiche come quella cognitiva e affettiva. La tossicodipendenza non è più solamente definita dal ciclo "assunzione ripetuta della sostanza = effetto piacevole", ma anche dal controllo consapevole e dal ricordo di tali effetti – anche a distanza di molto tempo dalla disassuefazione – con il rischio elevato della ricaduta all'uso della droga. La prevenzione della ricaduta è il principale obiettivo terapeutico della disassuefazione dalla tossicodipendenza. È quindi importante capire i meccanismi, i processi e i relativi fattori determinanti che possono indurre la ricaduta anche dopo molto tempo che l'assunzione della sostanza è stata interrotta (Tabella 7.2).

Adattamento e stadi della tossicodipendenza

Si è visto che tutte le droghe che inducono tossicodipendenza inducono dipendenza psicologica e contengono sostanze che possiedono proprietà di rinforzo. Nonostante la diversità chimica e i diversi bersagli recettoriali che le sostanze d'abuso legano nel cervello, esiste un comune meccanismo d'azione alla base della capacità di agire come rinforzo. È stata infatti identificata nel cervello una via neuroanatomica dove tutte le sostanze rinforzanti agiscono aumentando il rilascio del principale neurotrasmettitore, la dopamina. Neuroni dopaminergici presenti nell'area del mesencefalo chiamata area del tegmento ventrale (VTA) proiettano i propri assoni in un'area nel corpo striato ventrale detta nucleus accumbens (NAc) e in corteccia prefrontale (Figura 7.1). L'aumentata frequenza

TABELLA 7.1 Classi di droghe e sostanze d'abuso

Classi di droghe	Sostanze d'abuso	Effetti clinici
Ipnotici sedativi	Bevande alcoliche (etanolo)	A basse dosi inducono effetti euforizzanti, mentre ad alte dosi inducono disturbi della coordinazione motoria, della percezione e delle funzioni cognitive, azione ipnotico-sedativa; l'intossicazione può portare a coma e morte
	Oppiacei (morfina e derivati, eroina, metadone)	Effetti sedativi e ad alte dosi ipnotici; a dosi maggiori inducono coma e morte
Psicostimolanti	Cocaina, amfetamine, metamfetamina, nicotina, cannabinoidi	Riduzione dell'appetito, stimolazione motoria con riduzione dell'affaticamento, euforia, forte desiderio per la sostanza, stato d'attivazione generale, incapacità di controllo dei comportamenti, pensieri ossessivi
Allucinogeni	Acido lisergico (LSD), mescalina, psilocibina, cactus e funghi allucinogeni	Esaltano e deformano le percezioni attraverso i sensi; spesso si può verificare uno stato psicotico; anche i cannabinoidi possono indurre effetti allucinogeni
	Fenciclidina (polvere degli angeli) e chetamina	Induzione di stato psicotico
Empatogeni	Ecstasy (metilendiossiamfetamina MDMA) e derivati	Facilitano l'empatia e la disponibilità affettiva a livello interpersonale; da questo derivano le azioni disinibitorie, dal punto di vista motorio e affettivo; l'effetto acuto è seguito da una fase latente di natura depressiva che, a seconda dei soggetti, può durare anche giorni

TABELLA 7.2 Definizioni e concetti relativi alla tossicodipendenza*

Fenomeno o criterio diagnostico	Definizione
Abuso	Uso ricorrente della sostanza, per scopi non medicinali, con risultanti menomazione o disagio clinico
Sostanza d'abuso	Termine generico per indicare sostanze o molecole ad azione psicoattiva con proprietà di rinforzo
Proprietà di rinforzo	Capacità di indurre un effetto farmacologico piacevole a livello psichico e quindi probabilità di ripetere l'uso della sostanza stessa
Uso ricreazionale o sociale	Uso della sostanza solamente durante determinate situazioni, come in compagnia, alle feste ecc.
Dipendenza da sostanza	Modalità patologica di uso di una sostanza
Dipendenza psicologica	Adattamento psico-comportamentale; si manifesta principalmente con comportamento compulsivo, difficoltà a smettere, difficoltà a rimanere astinente anche nel lungo termine
Dipendenza fisica	Adattamento fisico responsabile della crisi di astinenza somatica
Crisi d'astinenza	Insieme di segni e sintomi che si manifestano alla cessazione brusca dell'uso della sostanza
Craving	Descrizione soggettiva di uno stato psichico di desiderio per gli effetti della sostanza; è spesso causa di ricaduta e si può manifestare anche dopo anni d'astinenza; è uno dei principali obiettivi terapeutici della prevenzione della ricaduta
Ricaduta compulsiva	Recidiva del comportamento d'abuso di una sostanza dopo un periodo di astinenza
Cue reactivity	Reattività anomala a stimoli specifici; è l'insieme di risposte fisiologiche, psicologiche (ad esempio, il craving) e comportamentali (ad esempio, la ricaduta) che l'ex-dipendente può presentare quando esposto a stimoli e situazioni precedentemente associati alla sostanza di cui abusava

* Per definizioni più complete dei criteri diagnostici si suggerisce di fare riferimento ai criteri diagnostici del DSM-IV (Manuale Diagnostico Statistico dell'American Association of Psychiatry, 4ª ed. Milano: Masson, 1996) alla voce "Disturbi da Uso di Sostanze".

di scarica di potenziali d'azione dei corpi neuronali nella VTA portano alla liberazione di dopamina nelle aree anatomiche bersaglio. Questo sistema neuroanatomico è anche chiamato "vie del piacere" o – più correttamente dal punto di vista neuroanatomico e neurochimico – vie mesocorticolimbiche dopaminergiche (Box 1).

Le "vie del piacere" hanno un significato evolutivo ben definito. Esse regolano le risposte comportamentali ai rinforzi naturali – come cibo, acqua, sesso – in base agli stimoli sia che afferiscano direttamente all'organismo come il rinforzo stesso (detto primario), sia indirettamente, come la miriade di stimoli associati al rinforzo

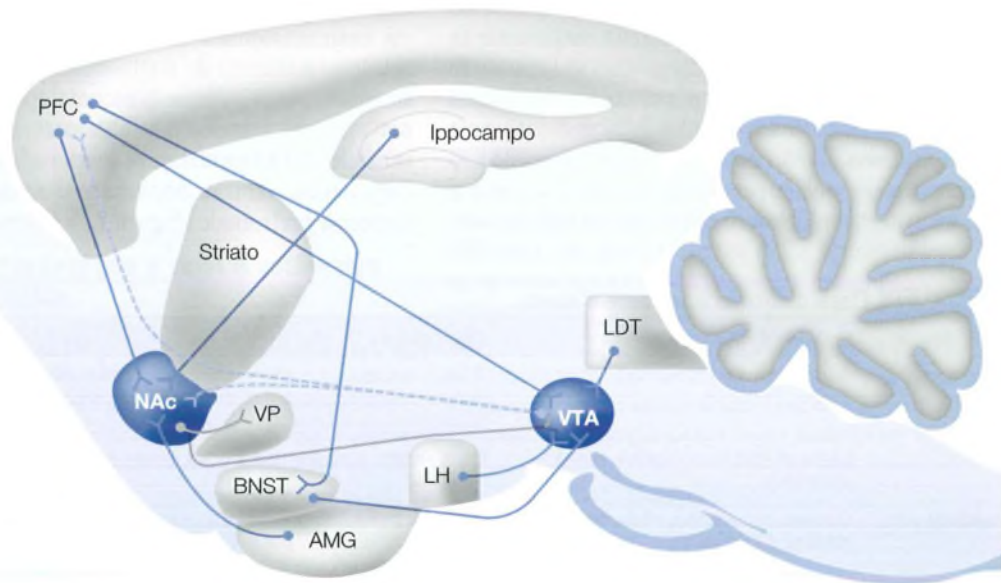


FIGURA 7.1 Vie mesocorticolimbiche dopaminergiche dette anche "vie del piacere". La figura rappresenta una sezione sagittale di cervello di ratto. In tratteggio, sono schematicamente raffigurate le proiezioni assoniche dai corpi neuronali dopaminergici dell'area del tegmento ventrale (VTA) alle terminazioni nel nucleus accumbens (NAc) e alla corteccia prefrontale (PFC). Altre aree cerebrali coinvolte dall'azione delle sostanze d'abuso sono l'amigdala (AMG), l'ippocampo, il globus pallidum ventrale (VP), il nucleo del letto della stria terminale (BNST), l'ipotalamo laterale (LH) e il nucleo laterodorsale tegmentale (LDT). Sono anche raffigurate in blu le principali proiezioni dei neuroni che utilizzano glutammato come neurotrasmettitore, e in grigio le proiezioni che liberano GABA, neurotrasmettitore inibitorio. (Da: Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. Nat Rev Neurosci 2007;8:844-58, modificata)

BOX 1 Meccanismi d'azione delle sostanze con proprietà rinforzanti

Vengono qui riassunti i meccanismi neurochimici indotti dalle più comuni sostanze d'abuso in acuto. Tutte queste sostanze hanno in comune la capacità di aumentare i livelli di dopamina nel sistema mesocorticolimbico, specificatamente nel nucleus accumbens e in corteccia prefrontale (Figura 7.1). Tuttavia, questo effetto di stimolazione del sistema dopaminergico, è indotto dalle varie sostanze d'abuso con meccanismi diversi.

- ▶ **Oppiacei.** Agonisti sui recettori degli oppioidi endogeni associati alle proteine G, rispettivamente denominati μ , δ e κ inducono inibizione degli interneuroni GABA nella VTA disinibendo così i neuroni dopaminergici della VTA; agiscono anche per stimolazione diretta dei recettori μ sui neuroni del nucleus accumbens stimolati dalla dopamina.
- ▶ **Cocaina.** Agendo come ligando sul trasportatore sinaptico della dopamina ne inibisce la ricaptazione e ne aumenta i livelli sinaptici nel nucleus accumbens e in corteccia prefrontale.
- ▶ **Amfetamine.** Stimolatori del rilascio di dopamina, ne aumentano i livelli sinaptici nel nucleus accumbens e in corteccia prefrontale.
- ▶ **Etanolo.** Modulatore positivo del recettore GABA, induce inibizione degli interneuroni GABA nella VTA disinibendo così i neuroni dopaminergici della VTA; altre possibili azioni sono di modulazione inibitoria del recettore per il glutammato NMDA riducendo così l'inibizione glutammatergica nel nucleus accumbens.
- ▶ **Nicotina.** Agonista sui recettori nicotinici per l'acetilcolina presenti in diverse localizzazione del sistema mesocorticolimbico e nel resto del cervello: la stimolazione dei recettori nicotinici sui neuroni dopaminergici della VTA aumenta il rilascio di dopamina; inoltre recettori presenti sulle terminazioni glutammatergiche favoriscono così l'attivazione glutammatergica nella VTA.
- ▶ **Cannabinoidi.** Agonisti sui recettori CB-1 e CB-2 dei cannabinoidi, si suppone che attivino i recettori CB-1 sui neuroni del nucleus accumbens stimolati dalla dopamina.
- ▶ **Fenciclidina e chetamina.** Sono antagonisti ai recettori per il glutammato NMDA riducendo così l'inibizione glutammatergica nel nucleus accumbens.

naturale e che ne segnalano la disponibilità (rinforzi secondari, come ad esempio suoni, immagini, odori). Il rilascio di dopamina a livello delle vie mesocorticolimbiche non media il piacere fisico, ma il ricevimento di un'informazione a valenza piacevole facilitandone l'apprendimento in un modo tale che questa possa regolare il comportamento motivato. La dopamina associa così salienza (rilevanza motivazionale) a un evento piacevole, permettendo così l'apprendimento di uno stimolo importante per un comportamento di sopravvivenza (nutrirsi, bere, accoppiarsi ecc.).

Le sostanze d'abuso inducono effetti simili ai piaceri naturali e talvolta, come spesso si sente dire a livello colloquiale, possono sostituire i rinforzi naturali. La principale anomalia delle sostanze rinforzanti ha origine nel modo diverso con cui stimolano il rilascio di dopamina. Gli stimoli naturali con rilevanza motivazionale rilasciano dopamina in virtù dell'attivazione delle vie mesocorticolimbiche in modo regolato e omeostatico. Le droghe agiscono in modo più intenso e protratto nel tempo, modificando l'omeostasi della risposta dopaminergica fisiologica e inducendo adattamento allostatico. Dal punto di vista quantitativo, i livelli sinaptici di dopamina possono essere più alti, oppure rimanere più a lungo a quelle concentrazioni che sono in grado di stimolare i recettori dopaminergici nel NAcc e nella corteccia prefrontale. Questa anormale risposta neurochimica delle sostanze d'abuso spiega il forte effetto rinforzante e, dopo trattamenti ripetuti, il conseguente adattamento.

L'adattamento molecolare e cellulare induce modificazione dei processi di rinforzo. I fenomeni che si osservano

– diversi da droga a droga e dipendenti dalla modalità di dosaggio – possono essere di tolleranza (con aumento graduale dei dosaggi), di dipendenza psicologica (alterazioni dell'affettività e dell'umore) e di sensibilizzazione (aumentata sensibilità a stimoli e situazioni che portano ad alto rischio di ricaduta). Questi fenomeni coinvolgono di conseguenza anche altre strutture neuroanatomiche implicate nella regolazione delle vie mesocorticolimbiche, come l'amigdala, l'ippocampo e la corteccia cerebrale. La tossicodipendenza viene così a svilupparsi non più come una modifica dei processi motivazionali, ma anche di quelli affettivi (la valenza emozionale dei rinforzi secondari) e cognitivi (il riconoscere le situazioni e gli stimoli secondari associati alla droga).

Il coinvolgimento graduale di tutte queste dimensioni psicologiche nell'adattamento della risposta alle sostanze d'abuso porta quindi a un disturbo multidimensionale, complesso e persistente. I meccanismi neurochimici modificati dalle sostanze d'abuso e il loro neuroadattamento suggeriscono la formazione di una sorta di memoria degli effetti piacevoli della droga (da ricercare) e di quelli spiacevoli dell'astinenza (da evitare).

Continuando l'analogia con i processi di memorizzazione, le prime esperienze con gli effetti delle droghe diventano comportamenti acquisiti come lo sono i normali processi motivazionali e di memoria dichiarativa. Questa fase di apprendimento è controllabile – volontaria – dove la ricerca e l'assunzione della sostanza può essere regolata. Tuttavia, la ripetuta esposizione alle sostanze d'abuso rinforzanti coinvolge gradualmente ma sempre maggiormente meccanismi neuronali deputati alla stabilizza-

zione delle memorie. Un graduale coinvolgimento della trasmissione glutammatergica dalla corteccia prefrontale al corpo striato e al talamo (il cosiddetto loop cortico-striato-talamico) porta gradualmente alla transizione da un processo esecutivo, volontario, a uno inconsapevole, compulsivo e automatico. Questo processo di adattamento è fisiologico quando apprendiamo a fare un compito di lavoro, inizialmente in modo consapevole – pensandoci – e poi a mano a mano che si impara “senza pensarci”. Dal punto di vista neuroanatomico questa forma di memoria è stabilizzata nel loop cortico-striato-talamico (Figura 7.2).

Una volta che il segnale di dopamina segnala in modo efficiente a imparare un comportamento motivato, e questo si è stabilizzato nella memoria, il rilascio di dopamina non è più necessario per rinforzare il comportamento d'assunzione della sostanza ma continua invece a segnalare la presenza degli stimoli associati a essa: i rinforzi secondari. I meccanismi dopaminergici sono quindi ancora attivabili in assenza della sostanza d'abuso in quelle situazioni e sotto gli stimoli che diventano determinanti della ricaduta al comportamento di ricerca della sostanza stessa.

Riepilogando, le varie fasi di adattamento neuronale dovute all'esposizione cronica alle sostanze d'abuso nelle aree cerebrali coinvolte nel mediare i comportamenti motivati portano gradualmente al coinvolgimento di altre aree e processi, affettivi e cognitivi, analogamente a quello che succede con gli altri tipi di memoria: tossicodipendenza quindi come forma di plasticità multidimensionale che diventa una memoria persistente, richiamabile da numerose situazioni e stimoli ambientali. La tossicodipendenza presenta una fase di “sperimentazione” e uso controllato, compatibile con le altre attività sociali e lavorative. In questa fase di apprendimento dei comportamenti c'è una relazione reversibile con il non-uso. La continuazione tuttavia dell'uso e dell'abuso consolida in una forma stabilizzata il comportamento, con perdita di controllo e difficoltà a modificarlo. I tentativi di disassue-

fazione sono spesso fallimentari a causa della difficoltà di superare i sintomi di astinenza fisica e psicologica, della comparsa di sintomi espressione dell'allostasi che si è instaurata, e al rischio di ricaduta. Questa è determinata non solo dallo stato del soggetto astinente, ma anche dalla presenza di un ambiente fortemente legato alla passata assunzione della sostanza.

Ricerca e terapia della tossicodipendenza

La ricerca degli ultimi anni ha confermato a diversi livelli la natura adattativa della tossicodipendenza. La complessità del disturbo, la diversità da sostanza a sostanza e la forte componente di risposta individuale (sono stati scoperti diversi fattori genetici associati ai vari tratti della tossicodipendenza) hanno portato allo sviluppo di diverse linee di ricerca basate sulle tecniche classiche di indagine molecolare, cellulare e comportamentale. L'utilizzo delle biotecnologie nella ricerca di base delle dipendenze ha permesso di indagare a fondo il ruolo delle modifiche dell'espressione genica nei meccanismi alla base del neuroadattamento alle sostanze d'abuso. Ricerche più recenti stanno indagando come i processi epigenetici possano essere coinvolti nella tossicodipendenza. L'approccio multidisciplinare con lo sviluppo di modelli animali ad alta validità predittiva sta rispondendo a maggiori necessità di traslazione dalla ricerca di base a quella sperimentale nell'uomo e nella clinica. In quest'ultimo campo, lo sviluppo delle tecniche di visualizzazione cerebrale non invasiva ha rivoluzionato la ricerca per le tossicodipendenze. È stato così possibile dimostrare la multidimensionalità e l'andamento temporale del neuroadattamento durante i vari stadi della tossicodipendenza. Poter vedere il cervello “in azione” ha permesso di studiare numerose funzioni cerebrali, processi psicologici, risposte comportamentali, danni neurologici e anomalie funzionali (anche in assenza

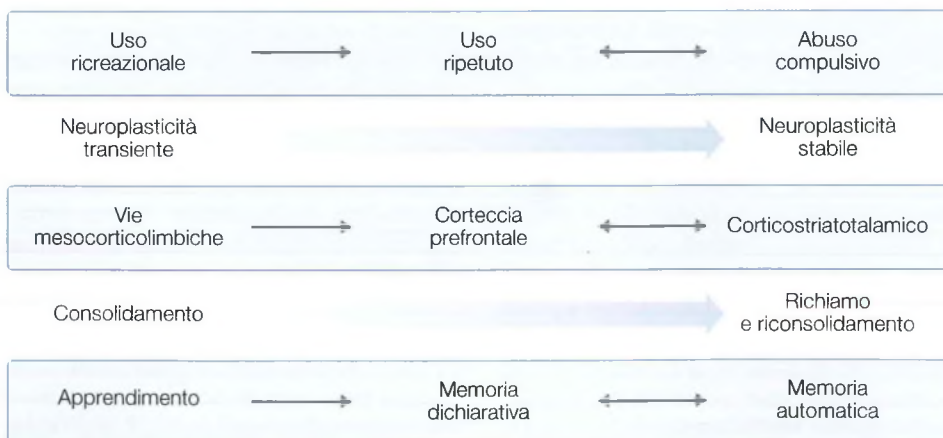


FIGURA 7.2 Analogia tra neuroplasticità indotta dall'esposizione cronica alle sostanze d'abuso corrispondente agli stadi del comportamento d'assunzione, principali aree cerebrali coinvolte e processi di apprendimento e memoria. (Da: Kalivas PW, O'Brien C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:166-80, modificata)

di danno) che sottostanno al disturbo della tossicodipendenza. Si stanno sviluppando combinazioni tra le differenti tecnologie di visualizzazione in modo tale da poter avere dati ad alta risoluzione spaziale (vedere le zone più piccole) con dati ad alta risoluzione temporale (vedere gli eventi più veloci) (vedi CD: Approfondimento 7.3. *Tecniche di visualizzazione cerebrale utilizzate per lo studio della tossicodipendenza*).

Le variazioni del flusso sanguigno cerebrale dopo inalazione di nicotina, misurate con la PET, hanno mostrato come questa sostanza induca delle modifiche simili a quelle indotte da altre sostanze d'abuso. Studi analoghi hanno mostrato come sia rilevante l'azione della nicotina in aree preposte a processi affettivi e cognitive nel fumatore. L'uso di marcatori neurochimici ha permesso di fare studi anche a livello molecolare, dando indicazioni non solo sull'area cerebrale coinvolta ma anche su quali sistemi neurotrasmettitoriali sono attivati in concomitanza degli effetti indotti dalla nicotina.

La tossicodipendenza è un disturbo cronico del comportamento, ciclico e recidivante. Le conoscenze sui meccanismi neurobiologici alla base dei suoi stadi e fenomeni hanno evidenziato la sua natura (mal)adattativa o allostatica. Essendo un disturbo complesso e multifattoriale, necessita di un intervento terapeutico integrato di tipo farmacologico, psicologico e sociale. A oggi non esiste una monoterapia farmacologica: l'efficacia farmacologica non supera il raddoppio delle astinenze a un anno in confronto a coloro trattati con placebo. L'efficacia aumenta se associata alla terapia psicologica motivazionale, cognitivo-comportamentale e di gruppo. Il problema principale rimane quello della prevenzione della ricaduta, che può avvenire anche molto tempo dopo la completa disassuefazione, in genere a causa di principali fattori determinanti come lo stress, la riassunzione occasionale e la presenza di stimoli condizionati. I tipi di terapia farmacologica correntemente approvati sono: a) la terapia sostitutiva; b) la terapia avversiva; c) la terapia anti-craving, e, in fase di prossima approvazione, l'immunizzazione con vaccini.

La terapia di sostituzione si basa sul rationale di non curare la dipendenza dalla sostanza ma di limitarne l'assunzione in termini di frequenza e danno. Consiste quindi nella somministrazione di una sostanza che simula pienamente o parzialmente la sostanza abusata. In genere questi farmaci sono agonisti parziali del recettore su cui si lega la sostanza stessa. Altre volte consiste nella sostanza stessa, ad esempio le gomme a base di nicotina per smettere di fumare. La terapia di sostituzione è risultata efficace nel favorire la cessazione riducendo principalmente la sintomatologia d'astinenza. Passata la fase critica del primo periodo di astinenza, la terapia di sostituzione deve però essere associata a un intervento di gestione delle componenti psicologica e ambientale. La terapia avversiva consiste nella somministrazione di una sostanza che induce effetti spiacevoli quando il soggetto riprende l'assunzione della sostanza d'abuso. Gli effetti si definiscono appunto avversivi, in quanto gli effetti negativi che inducono riducono la motivazione ad assumere la sostanza d'abuso. Un esempio è il farmaco disulfiram che, inibendo la degradazione dell'etanolo, accumula acetaldeide nell'organismo, la quale induce tutta una serie di effetti sgradevoli non tollerati.

La terapia anti-craving consiste nell'uso di alcuni farmaci efficaci per la prevenzione della ricaduta agendo direttamente sui meccanismi neurochimici alla base delle proprietà di rinforzo. Questi farmaci hanno diversi meccanismi d'azione e il loro profilo di efficacia appare agire su sintomi diversi. Non è ancora stato dimostrato se gli effetti neurochimici di questi farmaci siano direttamente responsabili dell'efficacia clinica (Tabella 7.3).

L'immunizzazione nei confronti delle sostanze d'abuso è ancora in una fase sperimentale in clinica, ma i risultati sono promettenti in termini di sicurezza e tollerabilità. Il meccanismo consiste nell'indurre una reazione anticorpale nei confronti della sostanza resa antigenica mediante coniugazione con un aptene. A immunizzazione indotta, il sistema immunitario reagisce alla presenza della sostanza nel plasma portando alla formazione di un complesso antigene/anticorpo che, per ingombro sterico, non

TABELLA 7.3 Farmaci approvati dalla Food and Drug Administration per il trattamento della tossicodipendenza in ordine cronologico di approvazione

Farmaco	Effetto clinico	Meccanismo d'azione
Disulfiram	Previene la ricaduta negli alcolisti	Inibitore dell'acetaldeide deidrogenasi
Metadone	Facilita il trattamento di detossificazione del dipendente da oppiacei	Agonista parziale dei recettori μ degli oppioidi endogeni
Sostitutivi a base di nicotina	Riducono i sintomi d'astinenza e aiutano nella disassuefazione da tabacco	Agonisti e antagonisti dei recettori nicotinici neuronali
Naltrexone	Riduce il consumo di alcol e previene la ricaduta negli alcolisti	Antagonista degli oppioidi endogeni
Bupropione	Possiede azione anti-craving; previene la ricaduta nei fumatori	Inibitore dei trasportatori per le catecolamine; antagonista dei recettori nicotinici
Buprenorfina	Efficace nella terapia di mantenimento del dipendente da oppiacei	Agonista parziale dei recettori oppioidi di tipo μ
Acamprosato	Previene la ricaduta negli ex-alcolisti	Agonista parziale indiretto dei recettori NMDA e metabotropi per il glutammato
Vareniclina	Previene la ricaduta nei fumatori	Agonista parziale dei recettori nicotinici $\alpha 4$ - $\beta 2$

passa la barriera ematoencefalica. La sostanza non entra così nel cervello, rimanendo nel plasma senza indurre effetti psicoattivi e venendo eliminata dall'organismo in modo sicuro, senza accumulo ed eventi indesiderati. La terapia farmacologica della tossicodipendenza presenta molte limitazioni. Nonostante la sua efficacia sia largamente dimostrata, funziona nel prevenire la ricaduta solo in una parte dei pazienti trattati. Nessun farmaco per la disassuefazione dalle sostanze d'abuso è una "pillola magica", e necessita quindi dell'integrazione con la terapia psicologica e sociale. Numerosi trial clinici e la pratica terapeutica hanno dimostrato come il trattamento integrato possa aumentare l'efficacia del farmaco utilizzato. Tuttavia, la biologia della tossicodipendenza non è ancora completamente sfruttata in modo terapeuticamente efficace; ad esempio, non si conoscono ancora farmaci che possano rendere reversibili i processi di neuroplasticità stabile indotti dalla esposizione cronica alle sostanze d'abuso; non si sa ancora se i trattamenti psicosociali efficaci siano in grado di indurre modifiche nel cervello.

Infine, rimangono sempre l'incognita e l'imprevedibilità delle conseguenze di situazioni, stimoli e ambienti a cui si esporrà l'ex-tossicodipendente dopo l'uscita dalla cura di disassuefazione all'esterno dell'ambiente ambulatoriale, dove è più forte il rischio di ricaduta.

Maggiore è la complessità che emerge dalla ricerca, a vari livelli biologici nell'organizzazione del cervello, maggiore è la criticità del potenziale trattamento farmacologico. A oggi, esso è limitato a pochi farmaci che aiutano nella disassuefazione ma non presentano un'alta efficacia. I migliori esiti terapeutici nel prevenire la ricaduta all'abuso di sostanze si ottengono tuttavia associando la terapia farmacologica a quella psicosociale. In conclusione, la tossicodipendenza è un disturbo che è diretta espressione dell'adattamento alle sostanze d'abuso, e che richiede uno sforzo congiunto di ricerca e terapia per poter meglio conoscere e intervenire a vari livelli e stadi del disturbo. Le conoscenze che ne derivano devono necessariamente essere poi tradotte in un'efficace e sicura traslazione nella pratica clinica della disassuefazione.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'adattamento è una caratteristica dei processi biologici che permette il raggiungimento di uno stato dinamico di equilibrio – allostasi – in risposta a condizioni ambientali mutate. Allostasi è anche la risposta adattativa ai farmaci e alle sostanze d'abuso.
- ▶ Sono state identificate modifiche persistenti in risposta all'esposizione cronica alle sostanze d'abuso a livello recettoriale, dei meccanismi di trasduzione, della regolazione dell'espressione genica e a livello post-traduzionale.
- ▶ Il trattamento farmacologico della tossicodipendenza è limitato a pochi farmaci che aiutano nella disassuefazione ma non presentano un'alta efficacia.
- ▶ I migliori esiti terapeutici nel prevenire la ricaduta all'abuso di sostanze si ottengono tuttavia associando la terapia farmacologica a quella psicologica e sociale.

Bibliografia essenziale

- ▶ Di Chiara G, Bassareo V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:69-76.
- ▶ Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 2005;8:1481-9.
- ▶ Kalivas PW, O'Brien C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:166-80.
- ▶ Koob GF, Kenneth Lloyd GK, Mason BJ. Development of pharmacotherapies for drug addiction: A Rosetta Stone approach. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:500-14.
- ▶ Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:119-28.

Farmacologia delle modificazioni post-traduzionali

Monica Di Luca, Flavia Valtorta, Fabrizio Gardoni

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le basi teoriche sulla modulazione fine delle proprietà biologiche delle proteine mediante processi noti come modificazioni post-traduzionali (MPT), caratterizzati da elevata dinamicità e, in molti casi, reversibilità
- ▶ Acquisire i concetti principali relativi alla complessità e alla dinamicità dei processi implicati nelle MPT in cellule eucariote al fine di comprendere come questi processi biochimici offrano un'ampia possibilità di aggressione farmacologica
- ▶ Acquisire nuove conoscenze sui principali inibitori delle differenti MPT delle proteine che possano avere un interesse da un punto di vista farmacologico

Tutte le cellule vanno continuamente incontro a cambiamenti del proprio stato al fine di rispondere agli stimoli che ricevono dall'ambiente esterno

La complessità e la dinamicità delle risposte a diverse stimolazioni sono garantite e regolate nelle cellule eucariote da un ampio e diversificato insieme di meccanismi, spesso tra loro interconnessi. Uno di questi, particolarmente rilevante e diffuso, si basa sulla modulazione fine delle proprietà biologiche delle proteine mediante processi

noti come *modificazioni post-traduzionali* (MPT), caratterizzati da elevata dinamicità e, in molti casi, reversibilità (Tabella 8.1).

Le MPT modificano le proprietà biologiche di una proteina attraverso l'aggiunta di gruppi funzionali a uno o più residui amminoacidici. Rappresentano quindi una modificazione *covalente* della proteina stessa che avviene successivamente alla traduzione dell'mRNA e in molti casi costituisce di fatto l'ultima tappa della via biosintetica ribosomiale della proteina.

TABELLA 8.1 Classificazione delle più importanti modificazioni post-traduzionali e principali funzioni e caratteristiche

Tipo di modificazione	Stabilità	Funzione e caratteristiche
Fosforilazione pTyr, pSer, pThr	+/>+++	Reversibile. Attivazione/inattivazione di attività enzimatiche, modulazione di interazioni proteina-proteina, signalling
SUMOilazione	+/>++	Reversibile. Regolazione della localizzazione cellulare e dell'interazione proteina-proteina; protezione dalla degradazione
Ubiquitinazione	+/>++	Reversibile. Ruolo nella degradazione di proteine danneggiate, mal funzionanti e con un folding alterato
Acetilazione Ministilazione, prenilazione, palmitilazione	+++	Reversibile. Regolazione della stabilità delle proteine, regolazione dell'interazione proteina-DNA
Idrossilazione	++	Regolazione della stabilità della proteina
Carbossilazione	+++	Modulazione della capacità di legare lo ione calcio
Metilazione	+++	Regolazione dell'espressione genica
Legami disolfuro	+++	Irreversibile. Stabilizzazione della struttura terziaria
Glicosilazione	+/>++	Reversibile. Regolazione della localizzazione cellulare, protezione dall'attacco di proteasi, regolazione del turnover
Aggiunta di lipidi	++/>+++	Regolazione della localizzazione cellulare
Aggiunta di glicosilfosfatidilinositoli	++/>+++	Ancoraggio alla membrana plasmatica, localizzazione sulla superficie cellulare

A oggi, grazie alle moderne tecnologie di indagine della struttura proteica, si conoscono più di 200 MPT, tra le principali possiamo annoverare la fosforilazione, la glicosilazione, la sumoilazione, l'acetilazione e le modificazioni che prevedono l'aggiunta di lipidi. Alcune MPT, come la glicosilazione, l'aggiunta di gruppi lipidici o la formazione di ponti disolfuro, sono stabili e rappresentano una tappa fondamentale del processo di maturazione e di ripiegamento, o *foldig*, delle proteine neosintetizzate e cooperano quindi alla stabilizzazione della struttura secondaria e terziaria delle proteine stesse. Altre, come la fosforilazione, sono reversibili e transienti e giocano un ruolo importante nella dinamica della risposta agli stimoli.

Una proteina può essere soggetta a una o più MPT presenti su residui amminoacidici differenti e che possono avvenire secondo uno schema temporale sequenziale definito. Le proteine così modificate possono essere riconosciute in modo specifico da altri elementi cellulari attraverso "domini specifici di riconoscimento" o *recognition domains*. La dinamicità dell'associazione tra proteine contenenti specifiche MPT e altri elementi cellulari caratterizzati da *recognition domains* genera nelle cellule associazioni/dissociazioni altamente dinamiche di complessi macromolecolari, processo responsabile in molti casi della decodificazione della risposta cellulare a diversi stimoli. La grande complessità e dinamicità dei processi implicati nelle MPT in cellule eucariote fa sì che questi processi biomichimici offrano un'ampia possibilità di aggressione farmacologica.

Fosforilazione

La fosforilazione è riconosciuta da molti anni come la più comune forma di MPT coinvolta nella regolazione delle proprietà biologiche delle proteine

L'introduzione di uno o più gruppi fosfato in una proteina ne determina una modificazione delle proprietà attraverso l'instaurarsi di una modificazione conformazionale della molecola stessa, con conseguente variazione dell'attività nel caso si tratti di un enzima o di un canale, oppure con la modificazione della capacità di interagire con altre molecole. La fosforilazione offre inoltre il vantaggio di un elevato grado di versatilità, legata al fatto di essere prontamente reversibile.

La fosforilazione è una MPT molto diffusa. Più di un terzo dei differenti tipi di proteine espresse da una cellula di mammifero è costituito da fosfoproteine, ovvero da proteine in grado di incorporare uno o più gruppi fosfato in maniera reversibile. Gli enzimi responsabili di questa MPT, ossia gli enzimi che incorporano e rimuovono gruppi fosfato da proteine, sono denominati rispettivamente chinasi e fosfatasi. Molti di questi enzimi esercitano la loro attività su più di una proteina substrato, rendendo possibile l'instaurarsi di risposte multiple in seguito a singoli stimoli. Inoltre, una singola proteina substrato può essere fosforilata da più di un enzima, determinando perciò una convergenza nella risposta a stimoli diversi.

Numerosi tipi di stimoli, quali ad esempio la modificazione del potenziale elettrico di membrana e segnali extracellulari, sono in grado di modificare l'attività delle proteinchinasi e fosfatasi e indurre quindi una variazione dello stato di fosforilazione di proteine cellulari. Questi processi possono avvenire in maniera diretta (ad esempio, nel caso di recettori aventi essi stessi attività enzimatica), oppure indirettamente attivando una cascata di reazioni enzimatiche. I mediatori che si legano a recettori di membrana associati a G proteine, determinando un'attivazione delle stesse, producono un'attivazione di enzimi (ad esempio, l'adenilato ciclasi) che in ultima analisi conduce a un aumento nei livelli intracellulari di un secondo messaggero (ad esempio, il cAMP). Il secondo messaggero, a sua volta, attiva una proteinchinasi (nel caso del cAMP la proteinchinasi cAMP-dipendente, PKA). In alcuni casi, la stessa reazione di fosforilazione è una reazione a cascata, in cui una proteinchinasi che fosforila un'altra proteinchinasi che a sua volta ne fosforila un'altra e così via. Lo stabilirsi di reazioni a cascata permette l'amplificazione, l'integrazione, la convergenza e la modulazione di molteplici segnali.

L'emivita di una proteina nel suo stato fosforilato dipende anche dall'attività enzimatica delle proteinfosfatasi che catalizzano la rimozione del fosfato stesso, e l'attivazione di questi enzimi è a sua volta modulata con meccanismi analoghi a quelli sopradescritti per le proteinchinasi. Si può perciò dire che in ogni momento della vita di una cellula lo stato di fosforilazione delle sue proteine rappresenta una fotografia della storia recente della cellula stessa.

Proteinchinasi

Le proteinchinasi derivano da una singola famiglia di geni che si è ampliata e diversificata nel corso dell'evoluzione

Tutte le proteinchinasi contengono infatti nella loro molecola domini funzionali analoghi (Figura 8.1A). In seguito al completamento del sequenziamento del genoma umano sono stati identificati 518 geni putativi per proteinchinasi. Questo numero elevato, che corrisponde a circa l'1,7% di tutti i geni umani, fa delle chinasi una delle più vaste famiglie di geni presenti nelle cellule eucariotiche.

La reazione di fosforilazione consiste nel trasferimento, catalizzato da una proteinchinasi, di un gruppo fosfato da un donatore a un accettore. Il donatore è nella grande maggioranza dei casi l'ATP, ma può anche essere il GTP. L'accettore è costituito da un gruppo idrossilico di un amminoacido di una proteina substrato e può essere una serina, una treonina o una tirosina. Questo porta alla classificazione delle proteinchinasi in due famiglie, le chinasi a serina/treonina e quelle a tirosina. Questo tipo di distinzione è anche giustificato dall'osservazione che le chinasi a serina/treonina e quelle a tirosina hanno modalità di attivazione diverse e trasducono segnali in maniera differente.

I gruppi fosfato incorporati in residui di tirosina sono di solito un quantitativo significativamente inferiore

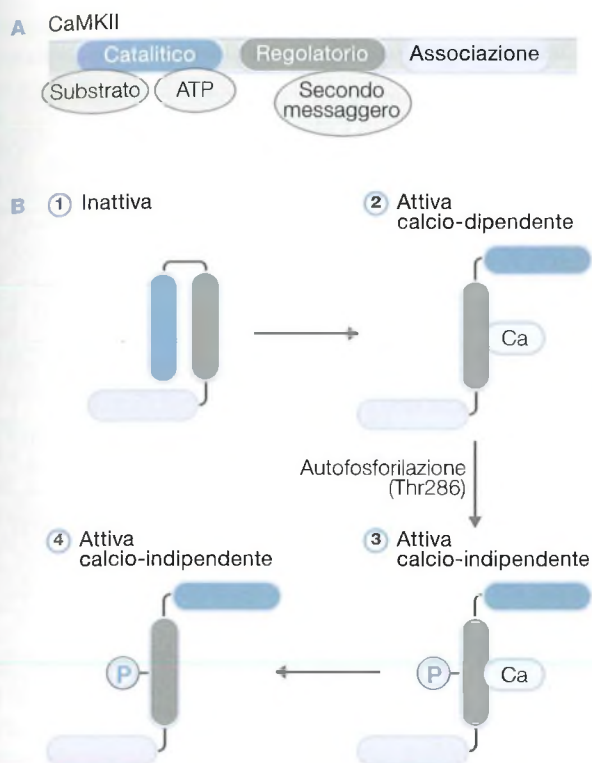


FIGURA 8.1 Struttura delle proteinchinasi e meccanismo di attivazione della proteinkinasi Ca^{2+} /calmodulina-dipendente di tipo II (CaMKII). **A**. Le proteinchinasi sono generalmente composte da diversi domini. Il dominio catalitico (contiene il sito di legame per ATP) e il sito di interazione con i substrati. Si ha quindi un dominio regolatorio, che contiene una sequenza inibitoria la quale blocca l'attività enzimatica in quanto, interagendo con il sito di legame con il substrato, ne impedisce l'interazione con il substrato stesso. Il dominio regolatorio contiene inoltre i siti di legame per i secondi messaggeri. In **B** è rappresentata la chinasi inattiva (1), con la regione catalitica (blu) mantenuta in stato di inibizione dall'interazione con la regione regolatoria (grigio), che funge da pseudosubstrato. Quando la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} aumenta, ioni Ca^{2+} formano un complesso con la calmodulina, e il complesso si lega alla regione regolatoria (2). In presenza di ATP, le molecole di chinasi a cui si è legato il complesso Ca^{2+} /calmodulina sono in grado di fosforilare molecole adiacenti della stessa chinasi (autofosforilazione intermolecolare), rendendo la chinasi attiva "calcio-indipendente" (3). In questa fase, il distacco dello ione Ca^{2+} non modifica lo stato di attivazione della chinasi (4).

rispetto ai gruppi fosfati presenti su residui di serina/treonina. Infatti, il rapporto di fosforilazione tra i differenti amminoacidi è approssimativamente 1000/100/1 per serina/treonina/tirosina. Questo non significa però che l'incorporazione di un gruppo fosfato in tirosina sia poco importante nell'economia cellulare; anzi, questa reazione gioca un ruolo fondamentale in processi importanti quali la crescita e il differenziamento cellulare.

Le varie proteinchinasi differiscono inoltre riguardo alla loro struttura e meccanismo di attivazione, nonché per la loro diversa localizzazione subcellulare. Una parte consistente di questi enzimi è costituita da molecole solubili che sono quindi localizzate nel citoplasma cellulare, mentre altre sono proteine integrali di membrana

o sono associate alle membrane tramite una modificazione lipidica della loro molecola. In alcuni casi, l'attivazione della proteinkinasi comporta una variazione nella sua localizzazione subcellulare. Ad esempio, la proteinkinasi C (PKC), che è in condizioni basali una proteina citosolica, quando viene attivata dal legame con lo ione Ca^{2+} si associa in maniera transitoria alla membrana plasmatica e ad altre membrane intracellulari a seguito di un'aumentata affinità dell'enzima attivato per componenti lipidici e adattatori proteici presenti nelle membrane.

Modalità di attivazione delle proteinchinasi a seconda delle necessità della cellula

La regolazione dello stato di fosforilazione delle proteine cellulari rappresenta un elemento di primaria importanza per la sopravvivenza della cellula ed è quindi facilmente comprensibile l'importanza di meccanismi in grado di regolare finemente l'attività delle differenti proteinchinasi a seconda delle necessità della cellula. Le proteinchinasi che risultano essere prive di un meccanismo di regolazione e quindi costitutivamente attive sono anche in grado di trasformare cellule normali in cellule maligne, e rientrano perciò nella famiglia degli oncogeni, come ad esempio la tirosinchinasi citoplasmatica della famiglia src e la tirosinchinasi recettoriale per il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR).

Si ritiene che la capacità trasformante di queste molecole sia proprio legata al fatto che si tratta di chinasi che hanno subito specifiche mutazioni, perdendo in questo modo una regolazione fine dei processi cellulari che ne regolano l'attivazione (vedi anche Capitoli 6 e 14). In tutti gli altri casi, le proteinchinasi posseggono un'attività catalitica basale molto limitata per la presenza di un meccanismo inibitorio, generalmente consistente in un dominio della stessa proteinkinasi che interagendo con il dominio catalitico ne blocca l'interazione con il substrato.

L'attivazione delle proteinchinasi può essere determinata da un legame con un secondo messaggero. Nel caso delle chinasi attivate da Ca^{2+} , è richiesta la presenza di un cofattore, che può essere la proteina calmodulina (che lega il Ca^{2+} e si lega poi alle proteinchinasi dette per l'appunto Ca^{2+} /calmodulina-dipendenti, Figura 8.1B) o molecole lipidiche quali il diacilglicerolo (nel caso della PKC). Nel caso della PKA, in condizioni di riposo la subunità catalitica è presente in complesso con la subunità regolatoria, che la mantiene in uno stato di inibizione. Quando la concentrazione di cAMP nella cellula sale, il cAMP si lega alla subunità regolatoria, determinandone il distacco dalla subunità catalitica. L'inibizione viene rimossa e la subunità catalitica può così fosforilare i substrati (Figura 8.2). In altri casi, l'attivazione della proteinkinasi richiede o comunque è accompagnata dalla fosforilazione o dalla defosforilazione della chinasi stessa. Nel caso in cui l'attivazione della chinasi comporti una reazione di fosforilazione, si tratta molto spesso di una reazione di autofosforilazione: la chinasi cioè fosforila se stessa e questa incorporazione di fosfato la rende capace di fosforilare altri substrati. Nel caso della proteinchi-

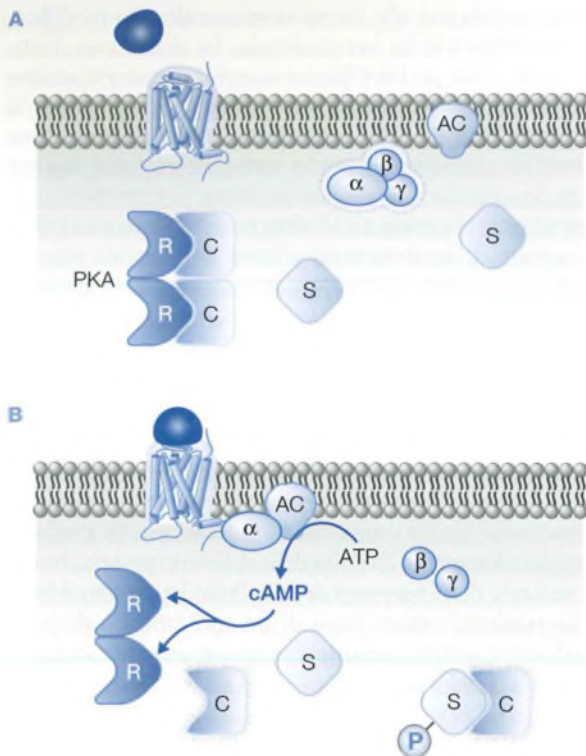


FIGURA 8.2 Attivazione della PKA. La proteinchinasi cAMP-dipendente (PKA) è formata da due subunità localizzate su polipeptidi distinti. In condizioni di riposo (**A**), la subunità catalitica (C) è presente in complesso con la subunità regolatoria (R), che la mantiene in uno stato di inibizione. Quando la concentrazione di cAMP nella cellula sale (**B**), il cAMP si lega alla subunità regolatoria, determinandone il distacco dalla subunità catalitica. L'inibizione viene rimossa e la subunità catalitica può così fosforilare i substrati (S).

nasi Ca^{2+} /calmodulina-dipendente di tipo II (CaMKII), l'autofosforilazione di uno specifico residuo di treonina converte l'enzima in una forma che non richiede più la presenza di Ca^{2+} e calmodulina per rimanere nello stato attivo (Figura 8.1b). Questo meccanismo permette anche di prolungare nel tempo gli effetti cellulari di segnali intracellulari mediati dallo ione Ca^{2+} , in quanto l'attivazione della proteinchinasi permane anche dopo che i livelli del secondo messaggero sono ritornati a valori basali. Questo meccanismo prevede un riarrangiamento conformazionale della chinasi, tale da "liberare" il sito catalitico dal blocco inibitorio.

Esistono anche dei casi in cui la chinasi è attiva, ma è il substrato che deve andare incontro a una modificazione conformazionale affinché possa essere riconosciuto dall'enzima. Ad esempio, la chinasi del β -recettore adrenergico (β ARK) è in grado di fosforilare il proprio substrato (il recettore β 2) solo quando questo ha legato la catecolamina. Lo spegnimento del segnale può avvenire secondo modalità diverse: può essere determinato semplicemente dal declino nella concentrazione del secondo messaggero che ha attivato l'enzima, o, ancora una volta, dalla defosforilazione o fosforilazione dell'enzima stesso.

Ciascuna proteinchinasi fosforila un numero limitato e specifico di proteine substrato

Una caratteristica importante delle proteinchinasi è quella di essere in grado di fosforilare solamente un numero limitato di substrati. In questo modo, l'attivazione di una via di trasduzione non comporta una generalizzata e aspecifica fosforilazione di proteine cellulari, ma solo di quelle rilevanti per la trasduzione di uno specifico segnale. Anche se esistono casi in cui una chinasi fosforila un unico substrato, nella maggior parte dei casi, i substrati fosforilabili sono più di uno (si veda ad esempio la CaMKII, che, proprio per la varietà dei substrati fosforilati, è anche detta proteinchinasi multifunzionale). I diversi substrati per una singola proteinchinasi possono anche essere molecole del tutto diverse tra loro, accomunati solo dalla presenza di sequenze amminoacidiche simili in prossimità dei siti di fosforilazione, le cosiddette "sequenze-consenso di fosforilazione" per quella chinasi. Come già detto in precedenza, in molti casi un singolo substrato può essere fosforilato da più proteine chinasi, ciascuna delle quali è attivata in seguito a segnali di tipo diverso. La fosforilazione di un singolo substrato in più siti può avere effetti cooperativi oppure antagonisti.

Proteinfosfatasi

Il processo di fosforilazione è reversibile attraverso l'attivazione di fosfatasi

Come già accennato, una delle caratteristiche più rilevanti del processo di fosforilazione è la sua reversibilità; in ogni momento della vita di una cellula il livello di fosfato incorporato in una specifica proteina è strettamente correlato all'equilibrio esistente tra il grado di attività delle proteinchinasi che ne catalizzano l'introduzione e il grado di attività delle proteinfosfatasi che ne determinano la rimozione.

Le proteinfosfatasi sono gli enzimi che idrolizzano il legame esterico dei residui di fosfoserina, fosfotreonina e fosfotirosina, determinando la rimozione del gruppo fosfato dalla proteina. La maggior parte delle proteinfosfatasi sono proteine a domini multipli che contengono una o più regioni catalitiche e altre regioni variabili di dimensione variabile. Analogamente a quanto già descritto per le proteinchinasi, anche le proteinfosfatasi si possono suddividere, a seconda del residuo amminoacidico riconosciuto, in proteinfosfatasi a serina/treonina e proteinfosfatasi a tirosina. Le tirosin fosfatasi legano solo la forma fosforilata dei loro substrati: la sequenza riconosciuta comprende infatti la tirosina fosforilata oltre che alcuni residui adiacenti. Pertanto, per questa classe di fosfatasi la selettività in vivo è dettata in primo luogo dal dominio catalitico. Oltre a presentare una struttura estremamente diversa da quella delle tirosin fosfatasi, le fosfatasi a serina e treonina sono oloenzimi costituiti da una subunità catalitica che lega una o più subunità con funzioni o regolatorie o di indirizzamento della proteina verso il legame con strutture subcellulari specifiche, quali ad

esempio il glicogeno o le miofibrille. Anche i domini catalitici delle serina-treonina fosfatasi sono altamente conservati, hanno una struttura tridimensionale simile e utilizzano il medesimo meccanismo d'azione.

Sono inoltre note fosfatasi a *funzione mista*, come ad esempio la Cdc-25, in grado cioè di defosforilare sia residui di fosfotirosina, che di fosfotreonina e fosfoserina, anche se ogni enzima presenta un'attività defosfatasi preferenziale. Anche queste fosfatasi hanno domini catalitici conservati, ma il legame al substrato avviene attraverso un sito che non contiene il residuo fosforilato. Interazioni proteina-proteina alle quali non partecipa il dominio catalitico sono quindi essenziali per regolare la specificità di questa classe di fosfatasi.

Le proteinfosfatasi sembrano possedere un minor grado di specificità rispetto alle chinasi, e sono quindi generalmente in grado di defosforilare un elevato numero di substrati. Inoltre, non sembra esistere una sequenza "consenso" per la defosforilazione da parte di una specifica fosfatasi, così che è difficile prevedere a priori quale fosfatasi sia responsabile per la defosforilazione di un certo substrato. In seguito a queste proprietà, l'intreccio tra proteinchinasi, substrati e proteinfosfatasi risulta notevolmente complesso, in quanto non esiste corrispondenza tra gruppi di substrati fosforilati da una certa chinasi e gruppi di substrati defosforilati da una certa fosfatasi. In pratica, due proteine possono essere fosforilate dalla stessa chinasi, ma defosforilate da fosfatasi differenti, e di conseguenza il loro stato di fosforilazione può essere regolato in maniera diversa.

I meccanismi di regolazione delle proteinfosfatasi non sono ben caratterizzati come quelli delle proteinchinasi, e inoltre sono diversi per i vari enzimi. Innanzitutto, il loro profilo di espressione spazio-temporale è strettamente controllato a livello trascrizionale. Un diffuso meccanismo di regolazione dell'attività delle fosfatasi è rappresentato dalle interazioni proteina-proteina.

Un singolo secondo messaggero (ad esempio, il cAMP) può al tempo stesso attivare una proteinchinasi e inibire una proteinfosfatasi tramite fosforilazione di un inibitore da parte della stessa chinasi. Questo meccanismo consente una notevole amplificazione del segnale, in quanto in questo modo i substrati che vengono fosforilati tendono a restarlo più a lungo. In altri casi, è lo stato di fosforilazione delle stesse fosfatasi a determinarne la maggiore o minore attività.

L'azione delle fosfatasi può avere molteplici conseguenze. La defosforilazione di una proteina può provocare cambiamenti della sua struttura terziaria e regolare il suo stato di interazione con altri componenti cellulari. La defosforilazione di proteine coinvolte in una via di segnalazione intracellulare può causare lo spegnimento di tale via. La maggior parte delle chinasi viene attivata attraverso la fosforilazione di residui interni al dominio di attivazione. Pertanto la defosforilazione di questi residui da parte delle fosfatasi inibisce l'attività catalitica della chinasi. Ad esempio, le MAP chinasi (MAPK) vengono attivate in seguito alla fosforilazione da parte delle MAP chinasi (MAPKK) di una tirosina e una treonina

presenti nel dominio di attivazione. La defosforilazione della fosfo-treonina da parte della fosfatasi 2A (PP2A) o di entrambi i residui da parte delle fosfatasi miste della famiglia MKP riduce l'attività delle MAPK (vedi anche Capitolo 8).

Sumoilazione

La sumoilazione consiste nella coniugazione covalente di SUMO a proteine substrato

La sumoilazione è una MPT implicata nella regolazione della funzione di numerose proteine e consiste nella coniugazione covalente di peptidi di 97 amminoacidi chiamati *Small Ubiquitin-related MOdifier* (SUMO) a proteine substrato. Il legame si realizza tra un residuo di glicina esposto al C-terminale di SUMO e un gruppo ϵ -amminico di un residuo di lisina presente nella proteina substrato.

Nelle cellule di mammifero sono state fino a oggi descritte quattro proteine SUMO denominate SUMO 1, SUMO 2, SUMO 3 e SUMO 4. Tutte le proteine SUMO sono sintetizzate sotto forma di precursori inattivi che sono poi sottoposti ad attivazione tramite metabolismo proteolitico. Il taglio proteolitico determina lo smascheramento di un motivo di di-glicina esposto al C-terminale di SUMO necessario per la coniugazione con il residuo di lisina della proteina substrato.

Nel corso di ogni ciclo di coniugazione (Figura 8.3), le proteine SUMO sono in primo luogo attivate con un meccanismo ATP-dipendente dall'enzima E1; l'attivazione prevede la formazione di eterodimeri (denominati SAE1 e SAE2 nei mammiferi) tramite legame tioestere tra il

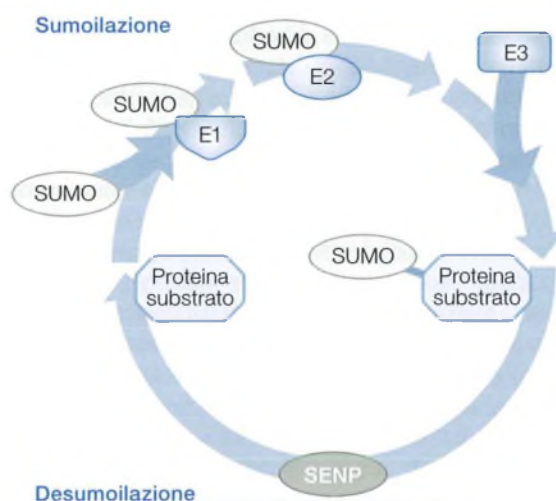


FIGURA 8.3 Sumoilazione. Le proteine SUMO sono prodotte in una forma immatura, tagliate al C-terminale da parte degli enzimi SENP, "attivate" tramite coniugazione con il sito attivo del complesso enzimatico E1 e passate al sito attivo del complesso E2 (Ubc9). Il passaggio successivo è rappresentato dalla coniugazione di SUMO, mediata da E2 in collaborazione con E3, al residuo di lisina della proteina substrato. La deconiugazione della proteina sumoilata è mediata dall'attività degli enzimi SENP.

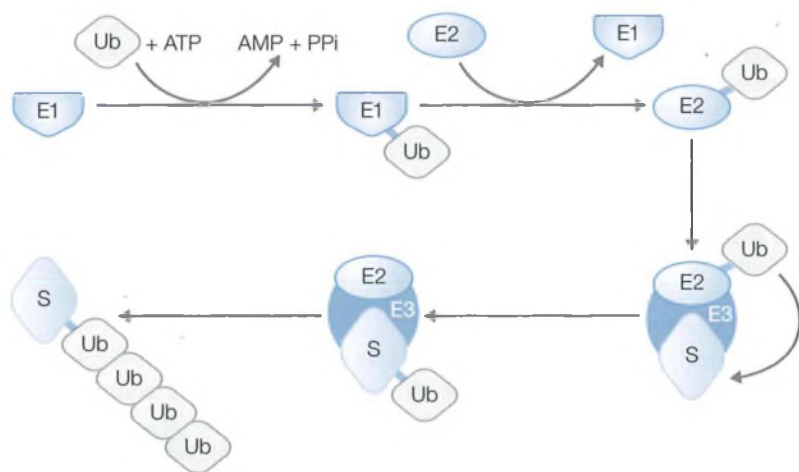


FIGURA 8.4 Ubiquitinazione. Il trasferimento della catena di ubiquitina a una proteina substrato avviene grazie a una serie di reazioni enzimatiche a cascata che coinvolgono enzimi specifici, quali enzimi attivatori di ubiquitina (E1), enzimi in grado di coniugare ubiquitina (E2), e ligasi specifiche (E3). Nella prima fase del processo, l'ubiquitina viene attivata, con il consumo di una molecola di ATP, attraverso la creazione di un legame ad alta energia con l'enzima E1. L'ubiquitina viene poi trasferita al sito attivo di un enzima E2 con una reazione di trans(tio)esterificazione, infine, tramite l'intervento di un enzima E3, in grado di interagire con il substrato da degradare e con l'enzima E2, l'ubiquitina viene trasferita al substrato (S).

dominio C-terminale di SUMO e un residuo di cisteina del sito attivo dell'enzima E1. Successivamente SUMO viene poi passato al sito attivo dell'enzima di coniugazione SUMO-specifico E2 (Ubc9, ubiquitin-conjugating 9) tramite un altro legame tioestere. In questa fase Ubc9, solo o con la cooperazione di altri enzimi denominati E3, può catalizzare la coniugazione di SUMO al residuo di lisina della proteina substrato. Nella maggior parte dei casi (~75%) la *sumoilazione* si verifica a livello di una sequenza consenso YKxD/E presente nella proteina substrato, nella quale Y rappresenta un ampio dominio idrofobico, K è la lisina target, e D/E residui con caratteristiche acide.

Nonostante sia caratterizzata dalla formazione di un legame covalente, la *sumoilazione* è una modificazione prontamente reversibile grazie all'attività proteolitica di enzimi denominati SENP. Il bilancio tra la coniugazione catalizzata da Ubc9 e la deconiugazione mediata dagli enzimi denominati SENP determina lo stato di *sumoilazione* di ogni specifica proteina substrato e il meccanismo che regola questo equilibrio è attualmente un campo di ricerca in veloce sviluppo.

Evidenze recenti hanno dimostrato che la *sumoilazione* rappresenta una reazione essenziale nelle cellule eucariotiche; infatti, knockdown o delezione di un componente importante del processo di *sumoilazione* come Ubc9 induce morte delle cellule. In particolare, lo studio della funzione della *sumoilazione* ha evidenziato il suo coinvolgimento nella modulazione di numerosi processi cellulari, quali ad esempio il mantenimento dell'integrità genomica, il ciclo cellulare, la localizzazione subcellulare e subnucleare di proteine substrato, la modulazione dell'interazione proteina-proteina, la repressione trascrizionale e la protezione dalla degradazione di proteine substrato attraverso il blocco dei siti di attacco dell'ubiquitina. La maggior parte delle proteine *sumoilate* che sono state identificate sono localizzate nel nucleo oppure coinvolte nel trasporto di proteine citosoliche.

Le conseguenze funzionali della *sumoilazione* sono strettamente dipendenti dal tipo di proteina substrato e dal sottotipo cellulare; è necessario tuttavia indicare

che a oggi la funzione della *sumoilazione* rimane in numerosi casi ancora non completamente conosciuta. Alcuni studi recenti indicano un diretto coinvolgimento della *sumoilazione* nella patogenesi e nell'insorgenza di patologie, soprattutto di tipo cardiovascolare.

Ubiquitinazione

Il legame dell'ubiquitina a una proteina ne favorisce la degradazione

Tutte le proteine cellulari sono soggette a un continuo turnover di sintesi e degradazione. L'emivita di una proteina eucariotica varia da mezzo minuto a molti giorni. Le proteine che più velocemente subiscono degradazione sono quelle anomale o con conformazione errata. Per molte proteine la degradazione avviene in modo preferenziale e accelerato a seguito di una MTP specifica, detta ubiquitinazione. Questa consiste nella coniugazione della proteina con ubiquitina, una piccola proteina regolatoria ubiquitaria nelle cellule eucariote (76 amminoacidi); la coniugazione avviene a livello di un residuo di lisina della proteina substrato per mezzo di un legame isopeptidico.

Il trasferimento della catena di ubiquitina a una proteina substrato avviene grazie a una serie di reazioni enzimatiche a cascata che coinvolgono enzimi specifici, quali enzimi attivatori di ubiquitina (E1), enzimi in grado di coniugare ubiquitina (E2), e ligasi specifiche (E3) (Figura 8.4). In particolare l'ubiquitina viene attivata, con il consumo di una molecola di ATP, attraverso la creazione di un legame ad alta energia tra il carbossile della glicina terminale dell'ubiquitina e un residuo di cisteina presente sull'enzima E1. Successivamente, l'ubiquitina viene trasferita su un'altra cisteina presente nel sito attivo di un enzima E2 (ne esistono diversi tipi) con una reazione di trans(tio)esterificazione. L'ultimo passaggio richiede l'intervento di un enzima ubiquitina-proteina ligasi (E3), in grado di interagire con E2 e, specificamente, con il substrato da degradare ed E2. Esistono centinaia di enzimi E3: la loro variabilità e l'azione coordinata con gli enzimi E2 garantisce estrema specificità all'intero processo.

Il processo di ubiquitinazione è reversibile grazie all'azione di una famiglia di proteasi specifiche dette deubiquitinasi. La funzione principale del processo di ubiquitinazione delle proteine è quella di degradare proteine danneggiate, mal funzionanti e con un folding alterato, contribuendo al mantenimento della corretta omeostasi cellulare. La via preferenziale di degradazione delle proteine ubiquitinate è rappresentata dalla via del proteasoma (vedi anche Capitolo 25). Tuttavia, i processi di ubiquitinazione sono anche coinvolti nella regolazione di molte vie di trasduzione del segnale.

Un funzionamento non corretto del sistema di ubiquitinazione con conseguente accumulo di prodotti ubiquitinati all'interno delle cellule è legato alla patogenesi molecolare di patologie quali il morbo di Parkinson.

Glicosilazione

La glicosilazione ha una forte implicazione funzionale, essendo responsabile tra l'altro della localizzazione subcellulare delle proteine

La glicosilazione, cioè l'aggiunta di carboidrati alla catena polipeptidica di una proteina, è una delle più comuni MPT. La maggior parte delle proteine che vengono glicosilate, nelle cellule eucariotiche, è destinata a diventare proteine di membrana. Inoltre una proteina glicosilata raggiunge un *folding* corretto e, in questo modo, può esplicare la propria funzione. La glicosilazione protegge dall'attacco di proteasi e influenza quindi la velocità di degradazione delle proteine e il loro turnover e aumenta la solubilità della molecola proteica che viene dunque stabilizzata in tutti gli aspetti. Infine, il meccanismo della glicosilazione è implicato nel controllo di qualità delle proteine, ove per *controllo di qualità* si intende un processo operato dalla cellula per scartare le proteine che non sono correttamente ripiegate (vedi **CD**: Approfondimento 8.1. *Modulazione farmacologica di alcune importanti modificazioni post-traduzionali*).

I principali zuccheri presenti nelle glicoproteine sono il glucosio, il galattosio, il mannosio, il fucosio e l'N-acetilglucosammina, che possono essere legati covalentemente all'asparagina (*N-glicani*) o alla serina/treonina (*O-glicani*) di una proteina. La complessità strutturale degli zuccheri richiede inoltre un processo di glicosilazione elaborato che impone un costo energetico alla cellula e avviene con una sequenza precisa di reazioni che si susseguono in modo concertato.

La N-glicosilazione ha inizio nel reticolo endoplasmatico rugoso a carico della catena peptidica ancora in corso di traduzione. La prima fase consiste nel trasferimento di una catena di 14 zuccheri (2 di N-acetilglucosammina, 3 di glucosio e 9 di mannosio) a un residuo laterale di asparagina. L'oligosaccaride è assemblato all'interno del reticolo endoplasmatico a partire da singoli carboidrati, ed è trasferito da uno speciale enzima, la glicosiltransferasi. L'attacco della catena glucidica può avvenire su un'asparagina qualsiasi presente nella sequenza primaria della proteina, purché inclusa in una sequenza di

consenso *Asn-X-Ser* o *Asn-X-Thr*, dove *X* rappresenta un amminoacido qualunque a esclusione della prolina. In un secondo tempo si ha la modificazione della catena di zuccheri appena aggiunta, sempre a livello del reticolo endoplasmatico. Qui sono rimossi ogni volta dalla catena 3 residui di glucosio e uno di mannosio. Successivamente le proteine che hanno subito sia la glicosilazione che la prima modificazione vengono trasportate, tramite vescicole, all'apparato del Golgi. Qui subiscono una sequenza ordinata di importanti cambiamenti tali per cui ogni specifica proteina viene riconosciuta e modificata in base alla futura funzione. Si possono riscontrare rimozioni o aggiunte di singoli zuccheri o di catene più lunghe; la specificità delle singole catene glucidiche è il meccanismo utilizzato dalla cellula per lo smistamento delle proteine alle varie sedi di destinazione.

La O-glicosilazione è un processo altamente specifico, che non vede l'aggiunta "seriale" di carboidrati alla proteina in via di maturazione. Si svolge interamente nell'apparato di Golgi dove gli zuccheri vengono legati al peptide a livello di un ossigeno di un residuo di serina o di treonina. L'aggiunta riguarda un singolo carboidrato alla volta; solitamente il numero di zuccheri legati durante questo processo è limitato a pochi residui.

I carboidrati spesso modulano le funzioni delle proteine, come nel caso dell'acido polisialico legato alle molecole di adesione neurale (N-CAM). Le glicoproteine presenti sulla superficie cellulare svolgono un ruolo cruciale nella comunicazione tra cellule, nel mantenimento della struttura cellulare e nel riconoscimento da parte del sistema immunitario. Pertanto, alterazioni delle glicoproteine sulla superficie cellulare possono produrre profondi effetti fisiologici. Ad esempio, la formazione di aggregati di eritrociti come si osservano nell'anemia diseritropoietica congenita di tipo II risulta dal taglio delle glicoproteine esposte sulla superficie di tali cellule. Inoltre numerosi virus, batteri e parassiti entrano nella cellula bersaglio sfruttando la presenza di carboidrati associati a proteine ed esposti sulla superficie cellulare. Viceversa, i residui di carboidrati delle glicoproteine sieriche e degli ormoni glicoproteici ipofisari sono coinvolti nei processi di rimozione dalla circolazione a livello renale ("clearance") oppure nell'indirizzare gli ormoni ai loro rispettivi organi bersaglio.

Inoltre, difetti nella corretta degradazione delle glicoproteine da parte di specifiche idrolasi lisosomiali (*glicosilasi*) sono alla base di patologie ereditarie (quali la mucopolidiosi) dovute all'accumulo abnorme di prodotti parzialmente degradati. Gravi patologie quali la mucopolidiosi II e III risultano invece da difetti nel trasporto delle glicoproteine ai lisosomi.

Acetilazione

L'acetilazione modula le interazioni proteine-DNA e proteine-proteine

Il trasferimento di un gruppo acetile dall'acetil-coenzima A a un gruppo ϵ -amminico di un residuo di lisina presente nella proteina substrato determina una neutraliz-

zazione della carica con conseguente alterazione delle proprietà biologiche della proteina substrato. Nonostante gli istoni non rappresentino i soli substrati di questa reazione, essendo stati i primi substrati identificati di enzimi che catalizzano l'introduzione e la rimozione di un gruppo acetile, questi enzimi sono stati denominati rispettivamente istone acetiltrasferasi (HAT) e istone deacetilasi (HDAC). Numerose altre proteine, come ad esempio fattori di trascrizione, proteine citoscheletriche e proteine coinvolte nel metabolismo cellulare, sono state identificate come substrato delle reazioni di acetilazione/deacetilazione. È infatti interessante osservare che a oggi è stata descritta l'acetilazione di centinaia di proteine cellulari, molte delle quali non-nucleari, e molte di queste sono localizzate a livello del mitocondrio. L'acetilazione di numerosi fattori di trascrizione, come ad esempio p53 ed E2F1, ne aumenta la capacità di legare il DNA target. Numerosi fattori di trascrizione possiedono un dominio della lunghezza di 60 amminoacidi, denominato bromodominio, in grado di riconoscere con elevata specificità residui di lisina acetilati. L'acetilazione è anche coinvolta nella modulazione di numerose interazioni proteina-proteina. Ad esempio, l'acetilazione di *Heat Shock Protein 90* (HSP90) ne aumenta la capacità di interagire con il recettore per i glucocorticoidi.

L'acetilazione degli istoni, determinando una riduzione dell'interazione istoni-DNA e dell'interazione istoni-istoni, e quindi un rimodellamento della cromatina, gioca un ruolo importante nella regolazione dell'attivazione dell'espressione genica (vedi **CD**: Approfondimento 8.1).

Idrossilazione

L'idrossilazione (β -idrossilazione), che consiste nell'aggiunta di un gruppo idrossile a un residuo di prolina, rappresenta una MPT riguardante soprattutto le proteine coinvolte nel metabolismo ossidativo. L'idrossilazione dei residui di prolina è catalizzata dalle monoossigenasi, meglio conosciute come idrossilasi. Questi enzimi necessitano di NADPH e di ossigeno portando alla liberazione di acqua. Nel complesso enzimatico è anche incluso il citocromo P450 che va a modulare una catena respiratoria nella quale gli elettroni possono fluire dall'NADPH all'ossigeno. Esempi di idrossilazioni si possono ritrovare nella sintesi dei glucocorticoidi e nelle reazioni di detossificazione di alcuni farmaci. Non sono stati descritte a oggi reazioni enzimatiche di rimozione di un gruppo idrossile né l'esistenza di enzimi in grado di mediare questo tipo di modificazione.

Carbossilazione

La carbossilazione (γ -carbossilazione) è una MPT che avviene prevalentemente a livello di un gruppo di proteine coinvolte nei processi di coagulazione e determina la conversione di un residuo di glutammato di una proteina substrato a γ -carbossilglutammato. Questo tipo di

MPT svolge un ruolo importante nella regolazione della capacità di legare lo ione Ca^{2+} , che rappresenta una caratteristica molto importante, e in alcuni casi essenziale, per il funzionamento di numerosi fattori della coagulazione (fattore VII, IX e X) e di altre proteine coinvolte nei processi di coagulazione (vedi **CD**: Approfondimento 8.1).

Metilazione

La metilazione modifica la struttura della cromatina controllando l'interazione della cromatina con proteine non istoniche

L'aggiunta di un metile a un residuo di lisina o di arginina a livello degli istoni rappresenta uno dei principali meccanismi epigenetici associati a modificazioni della cromatina. La metilazione può determinare l'aggiunta di uno, due o tre metili sullo stesso residuo amminoacidico. Analogamente a quanto avviene per altri tipi di MPT, due classi di enzimi, le metiltrasferasi e le demetilasi regolano in modo dinamico lo stato di metilazione delle proteine substrato. Recentemente, con il coinvolgimento delle metiltrasferasi e le demetilasi in una varietà di funzioni cellulari, tra cui la cancerogenesi e la progressione del tumore, la modulazione della metilazione cellulare è stata presa in considerazione come nuovo possibile approccio farmacologico nella terapia antitumorale. Tuttavia, a oggi, la ricerca in questo settore è in una fase iniziale e solo pochi possibili agenti in grado di modulare l'attività di specifiche metiltrasferasi e le demetilasi sono stati identificati, soprattutto a causa dell'assenza della struttura cristallografica degli enzimi coinvolti.

Nitrosilazione

Le proteine nitrosilate, e in particolare i tioli (formazione di proteine S-nitrosilate) rivestono un ruolo importante nella trasduzione del segnale. La nitrosilazione costituisce uno dei diversi meccanismi molecolari attraverso cui l'ossido nitrico può influenzare la trasduzione cellulare del segnale e vi sono inoltre numerose evidenze che suggeriscono un ruolo per la S-nitrosilazione sia nella attività cellulare fisiologica che in un ampio spettro di patologie. In particolare, recenti studi sperimentali hanno dimostrato come l'alterazione dei livelli di S-nitrosilazione di numerose proteine sia associata all'eziologia o alla sintomatologia soprattutto di patologie del sistema nervoso centrale, cardiovascolari o muscoloscheletriche.

Legami disolfuro

La formazione dei ponti disolfuro avviene per ossidazione dei gruppi tiolici dell'amminoacido cisteina. Legami disolfuro sono caratteristici di un ampio insieme di proteine extracellulari e di molte proteine utilizzate in

farmacologia, quali per esempio interferone, insulina ricombinante, anticorpi. Questo legame covalente stabilizza e mantiene la struttura terziaria delle proteine e anche la loro struttura quaternaria in complessi macroproteici, quali ad esempio gli anticorpi.

Siccome la formazione del legame disulfidico si basa su un processo di ossidazione, questo tipo di MPT non può avvenire nel citoplasma delle cellule sia eucariote che procariote, che mantengono uno stato di riduzione dell'ambiente citosolico. Quindi negli eucarioti, ad esempio, la formazione dei legami disolfuro avviene nel reticolo endoplasmatico.

Aggiunta di lipidi

Nelle cellule eucariotiche queste modificazioni post-traduzionali permettono l'ancoraggio delle proteine alla membrana plasmatica

Miristilazione

Consiste nell'aggiunta di acido miristico (acido grasso C14) a un residuo di glicina amminotermiale durante la traduzione. La glicina è generalmente il primo amminoacido della catena polipeptidica dopo che la metionina iniziale è stata rimossa. Molte proteine modificate da miristilazione sono associate al lato interno della membrana plasmatica.

Prenilazione

È l'aggiunta di un gruppo prenilo all'atomo di zolfo di una cisteina carbossiterminale. Il gruppo prenilo aggiunto in questa reazione può essere sia farnesile (C15) che geranilgeranile (C20), entrambi composti isoprenoidi derivati dalla biosintesi del colesterolo. Le due reazioni hanno luogo nel reticolo endoplasmatico e sono catalizzate rispettivamente dagli enzimi farnesiltransferasi e geraniltransferasi di tipo I o II. La prenilazione avviene a carico di una cisteina localizzata quattro residui prima dell'estremità carbossiterminale. Successivamente, i tre amminoacidi carbossiterminali vengono rimossi da una specifica endoproteasi e il gruppo carbossilico della cisteina terminale viene metilato tramite una reazione che utilizza S-adenosilmetionina come donatore di gruppi metile. Molte proteine associate alla membrana plasmatica che operano nel controllo della crescita e del differenziamento cellulare vengono modificate da prenilazione. Un importante esempio è rappresentato dalla G proteina oncogenica Ras, che viene farnesilata. Le subunità γ di numerose proteine G coinvolte nelle cascate di trasduzione del segnale sono invece modificate da geranilgeranilazione.

La prenilazione può essere indirettamente inibita attraverso gli inibitori della idrossimetilglutaril coenzima-A riduttasi, genericamente chiamati *statine*, che riducono la quantità di gruppi prenilati disponibili inibendo un passaggio cruciale della biosintesi del colesterolo. Le statine, grazie alla loro capacità di aumentare la clearance delle LDL, di aumentare il colesterolo HDL e di ridurre anche i

triglicedici plasmatici, rappresentano la classe di farmaci d'elezione nel trattamento delle ipercolesterolemie; numerosi studi clinici hanno dimostrato come il trattamento cronico con alcune specifiche statine (simvastatina, pravastatina) determini una riduzione statisticamente significativa della mortalità da malattia coronarica.

Dal momento che l'unità strutturale riconosciuta dalle prenil transferasi all'estremità carbossiterminale del substrato è il tetrapeptide CAAX (dove A è un amminoacido alifatico e X un qualsiasi amminoacido), farmaci che mimano questo peptide sono stati sviluppati e testati quali potenti e selettivi inibitori delle farnesil transferasi o geranil transferasi. Mutazioni oncogeniche di Ras sono implicate in oltre il 30% dei tumori dell'uomo. La scoperta che il meccanismo d'azione delle proteine della famiglia Ras dipende strettamente dalla farnesilazione rende la farnesil transferasi un bersaglio promettente della terapia antitumorale. Gli inibitori della farnesil transferasi riducono preferenzialmente la proliferazione delle cellule trasformate rispetto a quelle normali, dove mostrano inoltre un basso livello di tossicità.

Palmitilazione

È una delle MPT più frequenti e versatili. Si tratta dell'aggiunta di acido palmitico (acido grasso C16) allo zolfo di una cisteina interna alla catena polipeptidica. Contribuisce all'associazione delle proteine alla membrana e alla regolazione della loro localizzazione subcellulare. Inoltre, grazie alla sua reversibilità, la palmitilazione rappresenta un meccanismo di controllo dell'attività delle proteine di membrana, sia associate che periferiche. Numerose proteine vengono palmitilate a livello della membrana plasmatica. Tuttavia sono noti diversi casi di proteine la cui palmitilazione ha luogo sulle membrane intracellulari della via esocitica.

Aggiunta di glicosilfosfatidilinositoli

Si tratta dell'aggiunta di glicolipidi contenenti fosfatidilinositolo (GPI). La porzione oligosaccaridica viene attaccata al carbossile terminale della catena polipeptidica, facendo da ponte tra la proteina e il fosfolipide e per questo viene chiamata GPI-anchor. I GPI-anchors vengono aggiunti alle proteine nel reticolo endoplasmatico come unità preassemblate. La proteina modificata viene attaccata alla membrana plasmatica tramite la componente lipidica del GPI-anchor. Tra le proteine a cui viene aggiunto GPI si ricordano l'acetilcolinesterasi, la fosfatasi alcalina, l'antigene linfocitario Thy-1 e DAF (*Decay-Accelerating Factor*), un fattore che previene la lisi degli eritrociti da parte del complemento. La mancata aggiunta di GPI a DAF ne impedisce la localizzazione superficiale causando un'emolisi patologica, come si osserva nella emoglobinuria parossistica notturna.

Nel *Trypanosoma brucei* e nelle cellule di mammifero la produzione di GPI-anchor viene inibita dalla *mannosamina*, un omologo del mannosio che non viene riconosciuto come substrato dalla α_2 -mannosiltransferasi coinvolta

nell'assemblaggio della ramificazione glucidica del GPI-anchor. Una seconda classe di inibitori risulta specifica per il tripanosoma che, a differenza della cellula di mammifero, incorpora acido miristico nel GPI-anchor.

Sono stati identificati omologhi dell'acido miristico tossici per il tripanosoma ma non per la cellula di mammifero e quindi potenzialmente efficaci nel trattamento delle infezioni da parte di questo protozoo.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'importante sviluppo delle conoscenze relative alle MPT avvenuto negli ultimi 15 anni ha permesso sia una più approfondita comprensione della funzione della maggior parte delle MPT, e, soprattutto, ha permesso l'individuazione di alcune MPT quale nuovo possibile target farmacologico.
- ▶ La grande eterogeneità molecolare e l'elevata dinamicità delle MPT in cellule eucariote rendono questi processi biochimici un nuovo bersaglio di grande interesse da un punto di vista farmacologico per numerosi tipi di patologie.

Bibliografia essenziale

- ▶ An HJ, Froehlich JW, Lebrilla CB. Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins. *Curr Opin Chem Biol* 2009;13:421-6.
- ▶ Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007;5:981-9.
- ▶ Eisenhaber B, Eisenhaber F. Prediction of posttranslational modification of proteins from their amino acid sequence. *Methods Mol Biol* 2010;609:365-84.
- ▶ Lehman NL. The ubiquitin proteasome system in neuropathology. *Acta Neuropathol* 2009;118(3):329-47.
- ▶ Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 2003;21:255-61.
- ▶ Salaun C, Greaves J, Chamberlain LH. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J Cell Biol* 2010;191:1229-38.
- ▶ Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discov Today* 2010;15:773-80.
- ▶ Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J* 2010;428:133-45.

Regolazione dell'omeostasi del calcio intracellulare

CAPITOLO

9

Jacopo Meldolesi, Guido Fumagalli

Obiettivi formativi

- ▶ Conoscere i meccanismi generali cellulari di regolazione della concentrazione intracellulare di calcio ($[Ca^{2+}]_i$) in risposta a stimoli
- ▶ Conoscere i principali componenti molecolari responsabili del controllo della concentrazione intracellulare di calcio e la loro possibile modulazione farmacologica
- ▶ Comprendere il ruolo di diversi organelli intracellulari nell'omeostasi della concentrazione di calcio ($[Ca^{2+}]$) e i meccanismi che regolano la $[Ca^{2+}]_i$ all'interno di ciascun organello
- ▶ Conoscere le conseguenze dell'alterazione del controllo della $[Ca^{2+}]_i$ dovuta a cause patologiche

Tra i vari ioni contenuti nella materia vivente, il Ca^{2+} (calcio libero) è senz'altro quello che, dal punto di vista della regolazione, gioca il ruolo più ampio e importante. Da un lato, infatti, esso contribuisce al potenziale di membrana, dall'altro lato la sua concentrazione nel citosol e nel lume di tutti gli organelli, dal nucleo ai mitocondri, dal reticolo endoplasmatico (ER) all'apparato di Golgi, partecipa al controllo di una miriade di funzioni cellulari. In questo capitolo verranno trattati i fenomeni che regolano l'omeostasi del Ca^{2+} nel citosol e nei vari compartimenti cellulari. Poiché uno degli aspetti fondamentali del nostro discorso è l'equilibrio tra le varie forme del catione: libero, legato e totale, noi useremo l'indicazione Ca^{2+} per la prima mentre le altre due forme le scriveremo calcio, per sottolineare la loro completa o parziale indissociazione. Come per ogni altro ligando, l'equilibrio libero/legato dipende dal rapporto tra la concentrazione del Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$ ($[Ca^{2+}]_i$ = concentrazione media nel citosol; $[Ca^{2+}]_o$ = nello spazio extracellulare; $[Ca^{2+}]_{mit}$ = nella matrice mitocondriale) e quella dei siti di legame nonché dalla affinità di questi ultimi. Quando i siti sono in eccesso, tanto maggiore è la loro affinità tanto minore è la frazione di Ca^{2+} che resta libera (e viceversa, naturalmente).

Il citosol, crocevia di flussi di Ca^{2+}

Il Ca^{2+} citosolico libero è una minima frazione del calcio totale delle cellule

A riposo il calcio totale in tutte le cellule (con la sola, ma

non sorprendente, eccezione del globulo rosso) è 0,5-5 mmoli/litro, paragonabile ai liquidi extracellulari (~2 mmoli/litro). Questi valori hanno però un significato biologico profondamente diverso. Infatti, nel liquido extracellulare la concentrazione del calcio ionizzato, $[Ca^{2+}]_o$, è ~1 mM, corrisponde cioè a circa il 50% del calcio totale. Invece nel compartimento cellulare direttamente in equilibrio con l'esterno, il citosol, la concentrazione del Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$ è soltanto 50-100 nM, è cioè molte migliaia di volte più piccola del contenuto totale. Infatti la stragrande maggioranza del calcio cellulare è legato a un gran numero di molecole, presenti nel citosol oppure segregate all'interno di organelli. Queste proprietà, bassa $[Ca^{2+}]_i$ e ampio potere tampone, nonché il continuo equilibrio sia con l'ambiente esterno che con l'ER e i mitocondri, permettono al citosol di funzionare in modo flessibile ed efficiente come sede di moltissime funzioni regolate dal Ca^{2+} .

La $[Ca^{2+}]_i$ è il risultato dell'equilibrio fra meccanismi contrapposti. Gli aumenti della $[Ca^{2+}]_i$ indotti da stimolazione sono, il più spesso, transienti e determinati dal susseguirsi di processi contrapposti: l'influsso dall'esterno e il rilascio da depositi intracellulari sono i meccanismi di regolazione positiva; l'estruzione dalla cellula e l'accumulo in organelli intracellulari sono i meccanismi di regolazione negativa. L'influsso può avvenire attraverso canali ionici posti sulla membrana plasmatica, attivati da meccanismi diversi; il rilascio intracellulare per attivazione di canali nei depositi a rapido scambio. L'estruzione (lo ione viene riversato all'esterno della cellula) è effettuata da parte di pompe e scambiatori posti sulla membrana

plasmatica, mentre il suo sequestro negli organelli intracellulari è anch'esso a opera di pompe e trasportatori che però sono molecolarmente diversi da quelli di superficie.

**Un processo chiave di regolazione della $[Ca^{2+}]_i$:
l'attività tampone delle proteine citosoliche di alta affinità**

Oltre ai sistemi di regolazione dinamica della $[Ca^{2+}]_i$, bisogna considerare che nel citosol risiede un gran numero di molecole, soprattutto proteine, molte delle quali legano Ca^{2+} con alta affinità (vedi **cd**: Approfondimento 9.1. *Proteine citosoliche che legano Ca^{2+} con alta affinità*). Queste proteine sono in grado di limitare (sia quantitativamente che spazialmente) le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$ indotte dai vari meccanismi considerati sopra. Grazie alla loro presenza, il contenuto di calcio totale nel citosol è da 500 a 10.000 volte superiore alla sua frazione libera. A riposo la capacità delle proteine citosoliche di tamponare il Ca^{2+} non è saturata. Di conseguenza, quando gli ioni Ca^{2+} giungono nel citosol (dall'esterno e/o da compartimenti intracellulari), essi si equilibrano rapidamente con le proteine leganti. Un aumento della $[Ca^{2+}]_i$, ad esempio da 100 a 500 nM, richiede il trasferimento al citosol di quantità di Ca^{2+} fino a 50-100 volte maggiori.

La presenza delle proteine tampone influisce sostanzialmente sull'omeostasi del Ca^{2+} . Essa infatti non smorza soltanto gli aumenti e ne ritarda le diminuzioni, ma modifica anche la distribuzione di tutti i processi dinamici che dipendono dalla diffusione del Ca^{2+} . Nell'acqua la diffusione è davvero rapida, intorno a $350 \mu m^2/s$. Nel citosol però, proprio in conseguenza della presenza di proteine leganti ad alta affinità, la velocità è molto minore: i valori misurati variano tra ~ 15 e $50 \mu m^2/s$. Data la lentezza della diffusione, gli ioni possono saturare rapidamente il potere Ca^{2+} -tampone di quella piccola zona di citosol circostante il canale (di membrana o di un organello a rapido scambio) che si è aperto, e creare così un sito locale ad alta $[Ca^{2+}]_i$. Si formano così microterritori citosolici dove la $[Ca^{2+}]_i$ cresce fino a valori di 10 e (forse) di 100 μM , anche quando la $[Ca^{2+}]_i$ media dell'intero citosol non cresce significativamente oppure sale a valori modesti, inferiori a 1 μM . Un esempio, valido per tutte le cellule, è quello dello strato di citosol subito sotto la membrana plasmatica dove, anche a riposo, a causa della apertura, infrequente ma spontanea, di canali, la $[Ca^{2+}]_i$ è 5-10 volte più alta della $[Ca^{2+}]_i$ media. Una situazione di questo tipo ha un'influenza sostanziale sulla vita della cellula a riposo: vicino alla superficie possono avvenire processi impossibili nel profondo del citoplasma. In aggiunta a questa eterogeneità, dopo stimolazione si formano anche microterritori dinamici dovuti all'apertura regolata di canali. Spesso questi microterritori corrispondono a siti strategici della cellula, come ad esempio le zone attive della membrana presinaptica dove avviene la fusione delle vescicole (esocitosi Ca^{2+} -dipendente). Il fenomeno (assai rapido: $\sim 100 \mu s$) non è mediato da un enzima ma piuttosto dalla modifica conformazionale di una o più proteine. La sua affinità per il Ca^{2+} è piuttosto bassa. In questi microterritori, quindi, si raggiungono livelli di

$[Ca^{2+}]_i$ molto alti, tra 50 e 100 μM . Al contrario, la secrezione di granuli, ad esempio nelle cellule neuroendocrine, che è molto più lenta (minuti), può essere sostenuta anche da liberazione di Ca^{2+} dai depositi, iniziando già quando la $[Ca^{2+}]_i$ locale raggiunge valori molto più bassi, 1-5 μM . Microterritori ricchi di Ca^{2+} libero si formano anche nel profondo della cellula, ad esempio nella stretta striscia di citosol tra ER e mitocondri.

La membrana plasmatica: canali, pompe e trasportatori

I canali di superficie permeabili al Ca^{2+} sono di molti tipi diversi

L'influsso di Ca^{2+} , dallo spazio extracellulare al citosol, avviene attraverso canali ionici di varia struttura e funzione, regolati da meccanismi diversi. A cavallo della membrana plasmatica il potenziale elettrochimico del Ca^{2+} è più elevato rispetto a quello degli altri ioni. Infatti la smisurata differenza di concentrazione tra ambiente extracellulare e citosol (oltre 4 ordini di grandezza!) si aggiunge la negatività della superficie citosolica della membrana. Soltanto quando il potenziale è dissipato, anzi quando la superficie citosolica è divenuta elettropositiva (a livello teorico +150 mV almeno) si può immaginare un'inversione del flusso del Ca^{2+} . Tutte le cellule hanno quindi la possibilità di attivare rapidamente un influsso di Ca^{2+} semplicemente attraverso l'attivazione di canali di superficie. Il risultato sarà un aumento della $[Ca^{2+}]_i$ che almeno all'inizio sarà localizzato nell'area del citosol adiacente alla superficie della cellula. I vari tipi di canale coinvolti nei processi di influsso vengono distinti in base ai loro meccanismi di attivazione (Figura 9.1).

I canali attivati dal voltaggio (*Voltage Operated Channels*, VOCCs) sono descritti in dettaglio nel Capitolo 22 e schematizzati nella figura 9.1A. Essi sono bersaglio di numerosi farmaci e tossine, alcuni dei quali trovano ampio uso nella pratica clinica (ad esempio i calcio-antagonisti, utilizzati, tra l'altro, per il controllo della pressione arteriosa). Qui ci preme ricordare che i VOCCs, inizialmente ritenuti corredo esclusivo delle cellule eccitabili hanno una distribuzione ben più ampia essendo presenti, sia pure in concentrazione più modesta, anche in fibre muscolari lisce, in cellule gliali e, in qualche caso, persino nei fibroblasti.

Il secondo gruppo di canali per il Ca^{2+} comprende alcuni dei *recettori-canale* (*Receptor Ca^{2+} Channels*, RCCs) descritti nel Capitolo 12. In questo caso, l'apertura del canale ionico è attivata dall'interazione dell'agonista con il sito di legame presente nella macromolecola recettoriale (Figura 9.1B e C). I vari recettori-canale possono avere permeabilità estremamente diverse. Ad esempio, il recettore del glutammato sensibile all'acido N-metil-D-aspartico (recettore NMDA) è molto permeabile al Ca^{2+} , mentre il recettore colinergico nicotinico (AChR) di tipo muscolare è molto più permeabile all' Na^+ . Tuttavia, alcuni sottotipi neuronali di AChR sono permeabili al Ca^{2+} e la loro attivazione produce un significativo aumento della $[Ca^{2+}]_i$.

Il terzo gruppo dei canali del Ca^{2+} è quanto mai complesso ed eterogeneo. Da un punto di vista molecolare almeno una parte di questi canali fa parte delle 6 famiglie conosciute sotto le varie sigle TRP (*Transient Receptor Potential*). Si tratta di oltre 30 canali, solo una parte dei quali coinvolti nella regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} . In termini di meccanismo di attivazione un sottogruppo di questi canali, presente soprattutto in neuroni e cellule eccitabili (*Receptor-Operated Ca^{2+} Channels*, ROCCs), è direttamente accoppiato a recettori attraverso G proteine (il più spesso G_q ma anche G_o o G_i) oppure anche a recettori per fattori di crescita, ad esempio il recettore per il BDNF. Nelle cellule fornite di questi canali l'attivazione dei recettori specifici, oltre alle risposte classiche, provoca l'apertura del canale e il conseguente ingresso di Ca^{2+} (Figura 9.1D). I ROCCs, quindi, funzionano come integratori di risposte recettoriali, interessanti soprattutto per la loro localizzazione a livello di siti critici della membrana plasmatica. Il secondo sottogruppo (*Store-Operated Ca^{2+} Channels*, SOCCs), importante soprattutto nelle cellule non-eccitabili, è

legato per la sua attivazione allo svuotamento dei depositi di Ca^{2+} intracellulari, in particolare dei depositi dell'ER (Figura 9.1 e vedi CD: Approfondimento 9.2. *Canali di superficie, TRP, Orai e Socc*). La logica di questo sistema è chiara: ogni volta che i depositi liberano nel citosol il loro Ca^{2+} la cellula tende a perdere il catione per azione delle pompe/trasportatori della membrana plasmatica. L'apertura di un canale di superficie permette di compensare la perdita e quindi di salvaguardare l'omeostasi ionica.

Pompe e trasportatori rimuovono il Ca^{2+} dal citoplasma

Fondamentale per l'omeostasi del calcio è l'attività di pompe e trasportatori che promuovono l'estruzione del Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica e consentono il mantenimento o il ripristino dei bassi livelli di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ presenti nelle cellule a riposo.

A livello della membrana plasmatica sono presenti le pompe al Ca^{2+} (PMCA) che legano con alta affinità ($\sim 1 \mu\text{M}$) gli ioni Ca^{2+} del citosol e li trasferiscono allo spazio extra-

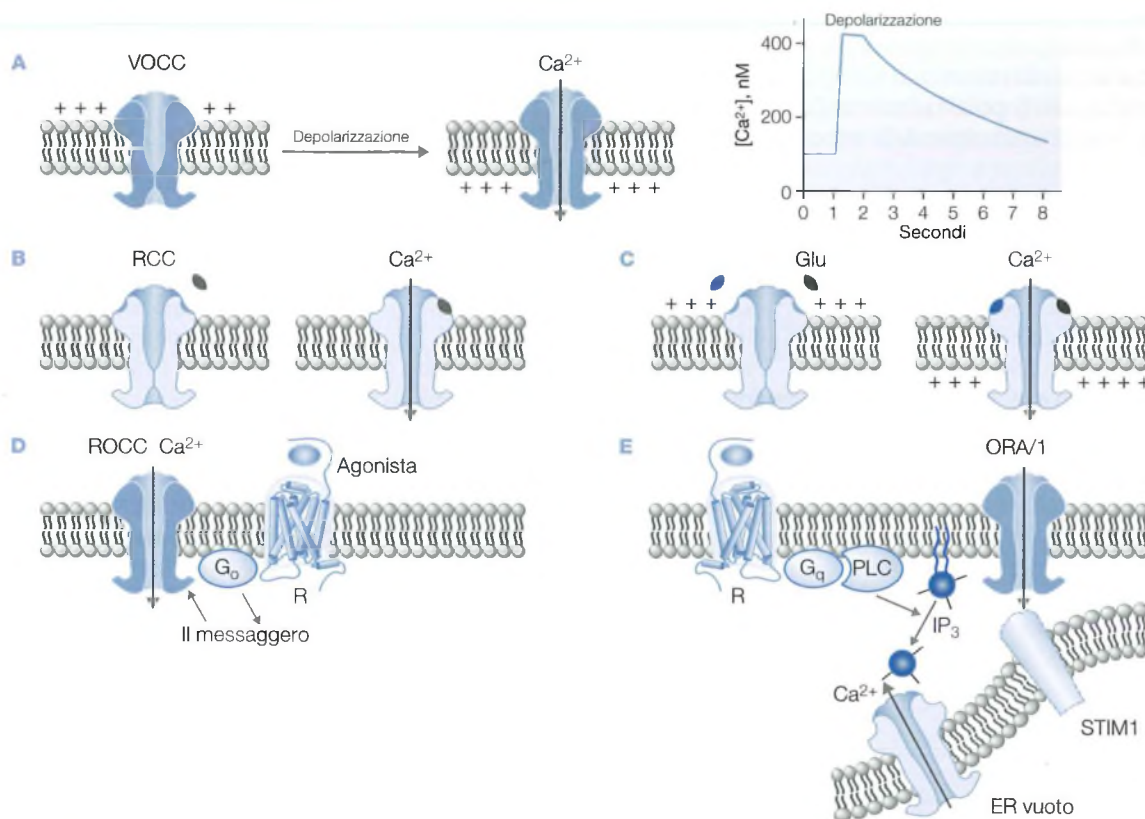


FIGURA 9.1 Canali al Ca^{2+} . **A.** L'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indotto dalla depolarizzazione è dovuto a un ingresso degli ioni Ca^{2+} attraverso i VOCC; la durata del transiente e dell'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del citosol dipende sia dalle cinetiche della loro attivazione/inattivazione (vedi Capitolo 22) che dall'efficienza di pompe e scambiatori la cui attività è necessaria per riportare $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ai valori basali (vedi Capitolo 23). **B.** L'ingresso attraverso gli RCCs è dipendente dal legame dell'agonista al recettore. **C.** Nel caso del recettore NMDA, un ruolo importante è giocato, oltre che dal glutammato, anche dalla depolarizzazione e da regolatori allosterici come la D-serina (vedi Capitolo 38). **D.** In molte cellule (soprattutto nervose e neuroendocrine), l'attivazione di recettori accoppiati alla produzione di IP_3 può attivare anche un altro tipo di canale, detto ROCC, mediante l'attivazione di una G proteina specifica (indicata qui come G_o). **E.** L'attivazione della PLC da parte di un recettore attraverso una G proteina specifica della famiglia delle G_q determina produzione di IP_3 che induce rapido rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari specifici. Lo svuotamento dei depositi attiva la dimerizzazione della proteina STIM1 nella membrana dell'ER che si ridistribuisce fino alla membrana plasmatica dove lega i canali SOCCs tipo ORA/1 e TRPC e attiva così un ingresso di Ca^{2+} nel citosol attraverso la membrana plasmatica.

cellulare (Figura 9.2A, Capitolo 23 e vedi **CD**: Approfondimento 9.3. *Pompe al Ca^{2+} di superficie e dei depositi a rapido scambio*). Quando $[Ca^{2+}]_i$ adiacente alla membrana plasmatica aumenta, il complesso Ca^{2+} -calmodulina si lega al sito regolatorio della PMCA e ne aumenta la V_{max} . In questo modo le PMCA sono in grado di monitorare in continuo la $[Ca^{2+}]_i$ superficiale della cellula e di adattare la loro attività alle variazioni di quest'ultima. Quando l'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ è elevato, molte cellule eccitabili (neuroni, fibre muscolari cardiache) rispondono attivando anche l'antiporto Ca^{2+}/Na^+ (Figura 9.2B e Capitolo 23), un sistema di più bassa affinità per il Ca^{2+} ($>5 \mu M$) che possiede però una capacità di trasporto maggiore rispetto alla pompa. L'attività dello scambiatore è quindi fondamentale in cellule che, dopo stimolazione, sono esposte a frequenti e massicce variazioni della $[Ca^{2+}]_i$. L'antiporto è centrale per l'azione della digitale e degli altri glicosidi cardioattivi. Questi farmaci inibiscono l'attività della pompa Na^+/K^+ ATPasi e quindi riducono l'estrusione del Na^+ , con conseguente modesta depolarizzazione. L'accumulo graduale di ioni Na^+ nelle miocellule cardiache causa una diminuzione dell'attività dell'antiporto Ca^{2+}/Na^+ . Di conseguenza l'estrusione del Ca^{2+} è rallentata, più Ca^{2+} si accumula nel reticolo sarcoplasmatico, e più Ca^{2+} viene rilasciato dopo stimolazione. Ciò causa un aumento della forza di contrazione delle miocellule cardiache.

Il Ca^{2+} negli organelli intracellulari

Anche negli organelli il calcio è in parte legato e in parte libero, e i due pool sono in equilibrio tra loro. In questo caso, però, le proteine di legame sono di affinità molto più bassa rispetto alle proteine del citosol. Di conseguenza il pool libero è molto grande e il suo trasporto al citosol, dove svolge molte funzioni regolate, può essere rapido.

Il reticolo endoplasmatico: un deposito intracellulare a rapido scambio

L'ER è un sistema continuo di membrane presente in tutte le cellule eucariotiche (meno il globulo rosso). La sua superficie di membrana varia da circa $10 m^2/g$ di tessuto nel pancreas esocrino fino a pochi cm^2/g in linfociti e in molti altri tipi di cellule. Tradizionalmente il reticolo viene distinto in una porzione granulare (o rugosa), coinvolta nella sintesi di proteine secretive o di membrana, e una porzione liscia. Entrambe queste porzioni partecipano all'omeostasi del Ca^{2+} . Il processo di liberazione dalle cisterne dell'ER si distingue da quello dei canali della membrana plasmatica perché è localizzato non alla superficie ma nella profondità del citoplasma. Studi specifici hanno portato a riconoscere nell'ER zone specializzate, alcune delle quali particolarmente importanti quali depositi a rapido scambio del Ca^{2+} . Nel muscolo striato (scheletrico e cardiaco) l'ER è quasi completamente formato da una porzione specializzata, detta reticolo sarcoplasmatico, le cui cisterne terminali sono caratterizzate dall'alta concentrazione di proteine responsabili del deposito e della liberazione rapida del Ca^{2+} . Poiché queste proteine sono di bassa affinità, esse non rallentano sensibilmente la diffusione del Ca^{2+} , che può quindi essere pompato anche in cisterne localizzate a distanza da quelle terminali. Anche nelle cellule non-muscolari l'ER è eterogeneo a causa della distribuzione non parallela dei tre costituenti fondamentali: pompe al Ca^{2+} ; proteine luminali leganti il Ca^{2+} ; canali ionici intracellulari.

Pompe e canali dell'ER sono molecolarmente e funzionalmente diversi da quelli della membrana plasmatica. In breve, il funzionamento dei depositi dell'ER può essere descritto come segue: quando i canali si aprono, il Ca^{2+} contenuto nell'organello si libera producendo un aumento della $[Ca^{2+}]_i$ locale che poi si può estendere al

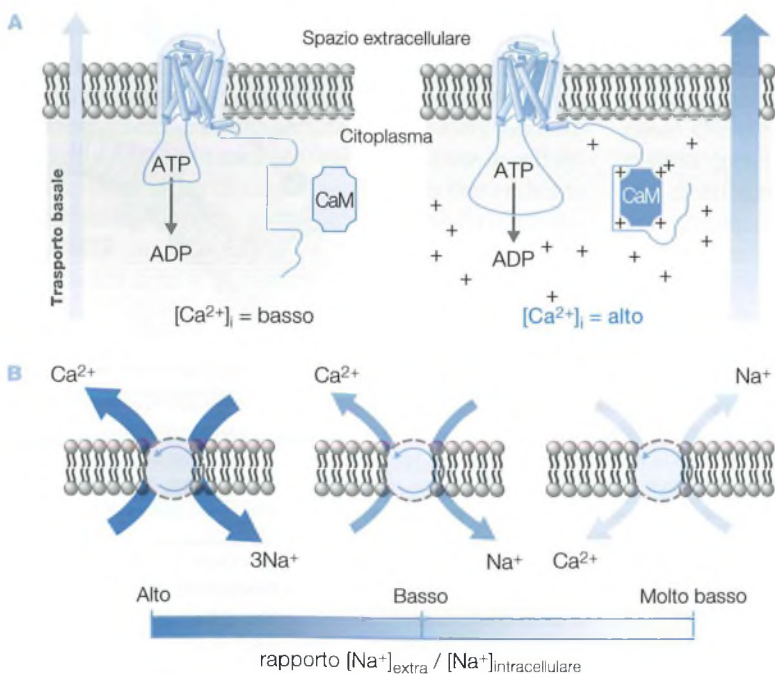


FIGURA 9.2 Estrusione del Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica. **A.** Le pompe al Ca^{2+} della membrana plasmatica sono quattro Ca^{2+} -ATPasi che consumano una mole di ATP per mole di Ca^{2+} trasportata. La loro attività è stimolata (freccia grossa) dal complesso Ca^{2+} -calmodulina che si forma quando la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta; essa è anche dipendente dalla disponibilità intracellulare di ATP e sarà perciò compromessa in corso di ischemia. **B.** Lo scambiatore Ca^{2+}/Na^+ ha grande capacità ma bassa affinità per il Ca^{2+} ; esso è quindi molto efficiente soltanto quando la $[Ca^{2+}]_i$ è alta. Il rapporto tra Ca^{2+} e Na^+ trasportati è di 1:3. L'attività del trasportatore (indicata dal colore e dalle dimensioni delle frecce) è dipendente dal gradiente di Na^+ ; la riduzione di questo gradiente è responsabile dell'effetto inotropo positivo dei glicosidi cardioattivi. In condizioni di rapporto $[Na^+]_{extra}/[Na^+]_{intracellulare}$ molto basso, la direzione del trasporto può addirittura invertirsi.

resto del citosol. Grazie all'attività delle pompe, l'organello viene poi ricaricato di Ca^{2+} in breve tempo e reso disponibile per rispondere a un nuovo stimolo (Figura 9.3). Le proprietà cinetiche qui accennate non si ritrovano solo nell'ER ma anche nel cisGolgi.

Spesso indicate con l'acronimo SERCA (*Sarcoplasmic-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase*), le pompe dei depositi a rapido scambio sono distribuite ampiamente nelle membrane dell'ER/cisGolgi. Questi organelli, quindi, accumulano Ca^{2+} da quasi tutta la loro superficie (vedi CD: Approfondimento 9.4. *Proteine che legano Ca^{2+} nel lume dell'ER*).

Le *proteine luminali leganti calcio* di questi depositi appartengono a diverse famiglie di cui la più nota è quella delle calsequestrine espresse dalle fibre muscolari. La loro funzione è quella di legare con bassa affinità grosse quantità di Ca^{2+} (fino a 50 ioni per molecola), riducendo così la concentrazione dello ione libero presente nel lume degli organelli. Queste caratteristiche sono importanti perché impediscono la precipitazione del Ca^{2+} mentre lo mantengono disponibile per una rapida liberazione quando i canali sono attivati.

I *canali ionici* che consentono la messa in comunicazione diretta del lume dell'ER con il citosol circostante sono di due classi: recettori della rianodina (un alcaloide vegetale usato sperimentalmente) e quelli dell'IP3. I canali del primo tipo (RYRs) sono almeno tre. Quello del muscolo scheletrico, concentrato alla superficie delle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmico, è accoppiato con il sensore del voltaggio (un VOCC di tipo L) presente nella membrana dei tubuli T della membrana plasmatica (Figura 9.4A), distribuiti trasversalmente e a distanza fissa lungo le fibre. La depolarizzazione indotta dall'acetilcolina a livello della placca neuromuscolare e trasferita attraverso l'attivazione dei VOCCs, con conseguente attivazione degli RYRs, induce la liberazione di Ca^{2+} dal reticolo al citosol, pressoché simultanea lungo la fibra muscolare, rendendone così possibile la contrazione coordinata. Negli RYRs di tipo 2 (cuore e neuroni) e 3 (ampia distribuzione) l'attivazione dipende soprattutto dai livelli locali di Ca^{2+} . È stato così coniato il termine di *Calcium-Induced Calcium-Release* (CICR, liberazione di calcio indotta da calcio). La caffeina (in concentrazioni mM, cioè "non alimentari") favorisce l'attivazione degli RYRs, mentre la rianodina ne impedisce la chiusura.

Anche gli IP3 recettori (IP3Rs) sono tre, diversi per caratteristiche cinetiche e presenti in rapporto diverso nei vari tessuti. La loro attivazione segue l'idrolisi del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato indotta dall'attivazione di recettori accoppiati alla Gq o forniti di tirosina chinasi. Gli IP3R non funzionano però secondo un modello chiuso/aperto ma sono modulati da molteplici ligandi, incluso il Ca^{2+} stesso, e dalla interazione con proteine, sia citosoliche che del lume dell'ER (Figura 9.4B) (vedi CD: Approfondimento 9.5. *Canali dell'ER: recettori dell'IP3 (IP3Rs) e della rianodina (RYRs)*).

RYRs e IP3Rs possono coesistere sulla membrana dell'ER o di sue porzioni specializzate. In questi casi l'aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indotta da IP3 si traduce, attraverso il CICR, nell'attivazione degli RYRs e quindi in un potenziamento dell'attività di rilascio del Ca^{2+} dai depositi a rapido scambio. IP3Rs e RYRs, insieme alle pompe, ai mitocondri e alle proteine citosoliche di alta affinità per il Ca^{2+} , sostengono processi coordinati che avvengono nel citoplasma di moltissime cellule, le oscillazioni (Figura 9.4C) e le onde di $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ogni onda/oscillazione ha un sito di origine, una specie di pacemaker da cui la liberazione di Ca^{2+} avviene preferenzialmente, in genere per l'alta concentrazione di canali. La lenta diffusione del Ca^{2+} alle zone adiacenti facilita l'attivazione di RYRs e IP3Rs, rendendo il processo autorigenerativo. Se esso rimane localizzato al sito del pacemaker, darà luogo a oscillazioni periodiche; se si sposta attivando successivamente gli RYRs e gli IP3Rs adiacenti, a un'onda indirizzata secondo un percorso nel citoplasma che nelle fibre (nei dendriti, ad esempio) può essere sia centrifugo che centripeto (vedi CD: Approfondimento 9.6. *Spikes localizzati danno origine a oscillazioni e onde di $[\text{Ca}^{2+}]_i$*).

I mitocondri sono, tra l'altro, ammortizzatori locali della $[\text{Ca}^{2+}]_i$

La storia del Ca^{2+} nei mitocondri è quanto mai accidentata. Negli anni 70 del secolo scorso erano ritenuti il deposito più importante della cellula, poi ci si rese conto che il loro sistema principale di captazione (il *Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter*, MCU, un trasportatore) è di affinità relativamente bassa ($K_d > 5 \mu\text{M}$), e se ne concluse che esso non può funzionare in una cellula se non dopo una intensa stimolazione, quando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cresce a valori elevati. Negli anni 90,

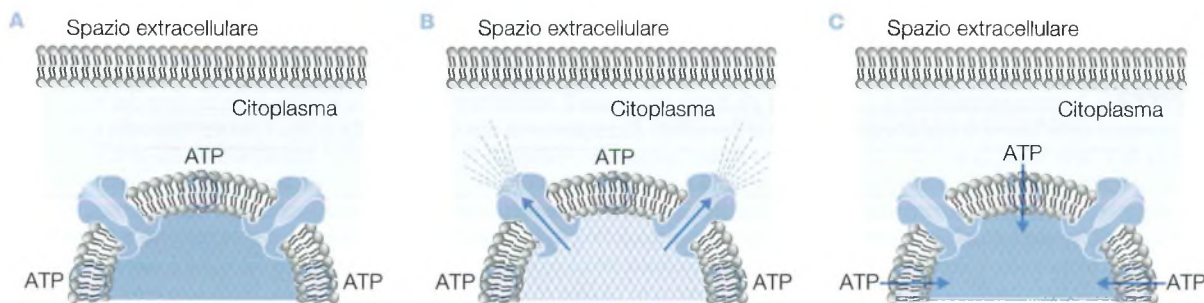


FIGURA 9.3 Depositi intracellulari di Ca^{2+} a rapido scambio (A). I depositi intracellulari di Ca^{2+} a rapido scambio sono organelli (ER, cis-Golgi) caratterizzati dalla presenza di pompe al Ca^{2+} della famiglia delle SERCA, di proteine luminali capaci di legare lo ione con alta capacità e bassa affinità e di canali specifici, RYRs e IP3Rs. L'apertura dei canali (B) provoca il rilascio dello ione Ca^{2+} dal lume dell'organello al citoplasma con conseguente aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Successivamente le SERCA ricaricano l'organello riducendo così la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (C).

però, si capì che i mitocondri non sono sempre organelli discreti ma sono in genere fusi in un reticolo ampiamente distribuito nella cellula e che questo reticolo non lavora da solo ma in collaborazione con l'ER. L'apertura degli RYRs e IP3Rs genera nella zona di citosol adiacente alla bocca di questi canali una "nube" di alta $[Ca^{2+}]_i$ che per un certo tempo (qualche secondo) satura i siti di legame delle proteine citosoliche Ca^{2+} leganti. Ne consegue che la $[Ca^{2+}]_i$ locale (cioè a livello della "nube") raggiunge livelli elevati (ad esempio, 10 μ M o anche di più), divenendo così trasportabile dall'MCU dei mitocondri localizzati strategicamente a breve distanza, secondo l'altissimo potenziale di membrana (~200 mV, negativo) a cavallo della membrana interna. Si spiega così come mai in condizioni di riposo l'accumulo di Ca^{2+} nei mitocondri sia molto limitato e come esso aumenti rapidamente quando la liberazione del Ca^{2+} dall'ER aumenta in seguito a una stimolazione anche modesta. L'accumulo del Ca^{2+} nei mitocondri non è irreversibile, anzi. Aumenti transitori possono essere smaltiti da antiporti che scambiano Ca^{2+} (verso il citosol) per H^+ o

Na^+ (Figura 9.4D). In termini di $[Ca^{2+}]_i$ locale i mitocondri servono a evitare che si raggiungano livelli citosolici troppo elevati, sono quindi degli ammortizzatori che permettono di prolungare nel tempo il segnale citosolico. Dopo avere accumulato in qualche secondo il Ca^{2+} dall'ER essi lo liberano per diversi secondi. Essi possono partecipare alle oscillazioni e alle onde di $[Ca^{2+}]_i$ oppure le possono arrestare rompendone il coordinamento spazio-temporale (vedi CD: Approfondimento 9.6 e Approfondimento 9.7. Il mitocondrio: un organello semiautonoma che ha bisogno dell'ER per funzionare).

ER e mitocondri permettono che la $[Ca^{2+}]_i$ si modifichi rapidamente anche in zone profonde della cellula

La lenta diffusione del Ca^{2+} nel citosol fornisce una spiegazione per il ruolo degli organelli a rapido scambio di Ca^{2+} . Se infatti, per cambiare la sua $[Ca^{2+}]_i$, la cellula potesse soltanto attivare i suoi canali di superficie, le regioni più interne sarebbero raggiunte in ritardo (di secondi!) rispetto a quelle superficiali, e tutta l'attività cellulare

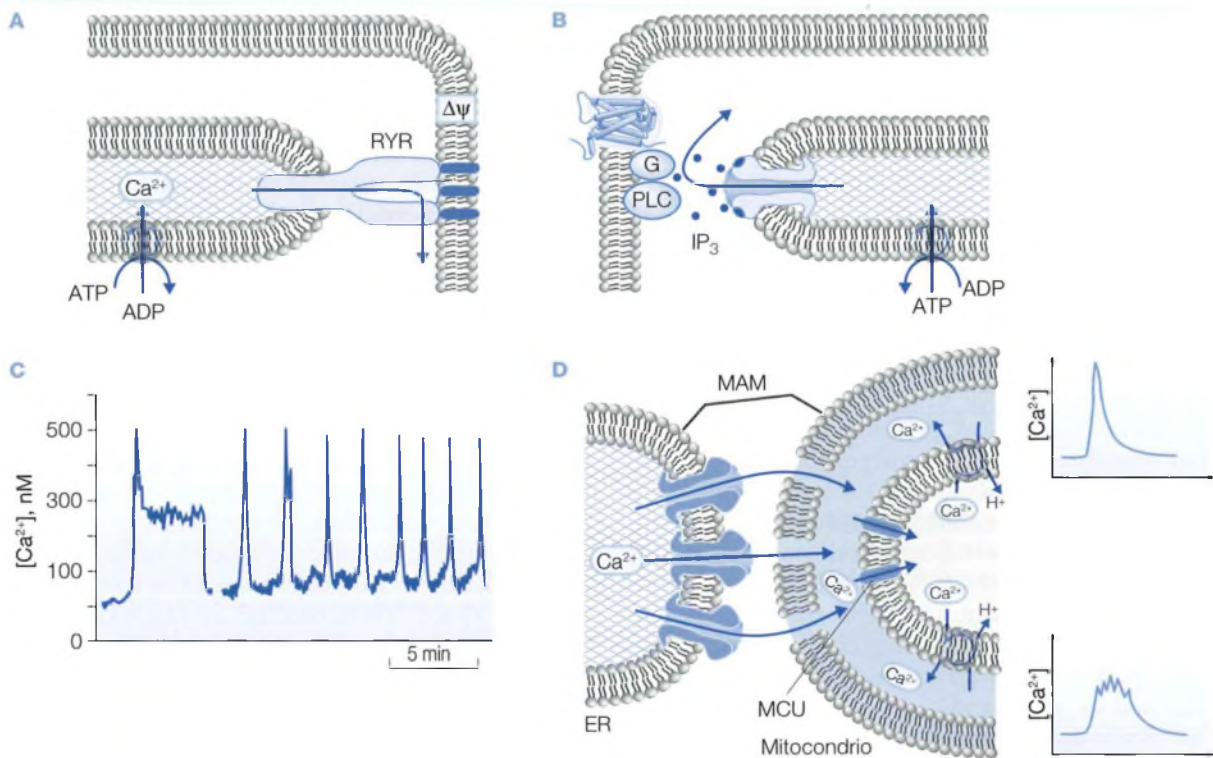


FIGURA 9.4 Depositi intracellulari di Ca^{2+} . **A.** Il RYR di tipo muscolare è concentrato nella faccia esterna delle cisterne del reticolo sarcoplasmatico delle fibre e la sua attivazione avviene per diretto accoppiamento con canali VOCCs di tipo L concentrati nella membrana del tubulo T delle triadi. Questi VOCCs funzionano come "sensori del voltaggio", cioè attivano i recettori intracellulari in conseguenza della depolarizzazione ($\Delta\psi$) della membrana in cui sono inseriti. **B.** L'attivazione degli IP3Rs avviene invece per legame dell'IP3 liberato nel citosol in seguito all'attivazione della fosfolipasi C (PLC) indotta da recettori di superficie. La sensibilità all'IP3 è modulata dal Ca^{2+} stesso, dall'ATP e dalla interazione con proteine luminali e citosoliche. **C.** Oscillazioni della $[Ca^{2+}]_i$ che si generano nelle cellule dopo stimolazioni. Mentre stimolazioni forti inducono la classica risposta picco-e-plateau (sinistra), stimolazioni più vicine a quelle fisiologiche inducono oscillazioni periodiche della $[Ca^{2+}]_i$. **D.** Coordinamento tra ER e mitocondri. L'attivazione degli IP3Rs in una zona specializzata della membrana dell'ER (Mitochondria-Associated Membrane, MAM), strettamente adiacente alla superficie mitocondriale, conduce rapidamente alla saturazione delle proteine citosoliche leganti Ca^{2+} dello spazio tra i due organelli e all'aumento locale della $[Ca^{2+}]_i$, a livelli sovra- μ molari, sufficienti per attivare l'MCU della membrana interna. L'aumento della $[Ca^{2+}]_{mit}$ è poi dissipato dai trasportatori Ca^{2+}/H^+ e Ca^{2+}/Na^+ . Le due tracce laterali mostrano la differenza tra gli spike indotti il primo (alto e stretto) dalla sola attivazione degli IP3Rs, il secondo (più basso e persistente) dall'interazione tra ER e mitocondri (vedi CD: Approfondimenti 9.6 e 9.7).

rischierebbe di svolgersi in modo sfasato. Invece la velocità di diffusione dell'IP3 è considerevole ($\sim 250 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Questo secondo messaggero può quindi consentire l'attivazione dei depositi a rapido scambio e, di conseguenza, dei mitocondri associati, in modo quasi sincrono in tutto il volume della cellula. Il rilascio è ulteriormente facilitato dal fatto che il funzionamento degli IP3Rs è modulato positivamente da modesti aumenti della $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Quindi le varie aree specializzate dell'ER dove sono localizzati RYRs e IP3Rs, e i mitocondri adiacenti, si aiutano l'un l'altro ad attivarsi nel processo di liberazione dei loro pool di Ca^{2+} . Per quanto riguarda gli RYRs del cuore, data l'esistenza dei tubuli a T, la liberazione di Ca^{2+} indotta da Ca^{2+} dagli organelli intracellulari è anch'essa un evento rapido e coordinato, attivato dall'influsso attraverso i VOCCs della membrana plasmatica; l'influsso nelle porzioni superficiali e il rilascio in quelle più profonde sono quasi contemporanei e le miofibrille si contraggono praticamente nello stesso momento, indipendentemente dalla loro posizione nella cellula.

Ancora più affascinante la situazione nelle cellule nervose. Qui i segnali sinaptici sono spesso generati dalla cooperazione tra canali di superficie e canali intracellulari. Essi possono limitarsi a microterritori (ad esempio, alle spine dendritiche postsinaptiche) dove hanno luogo oscillazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ che non si propagano al fusto del dendrite e al soma cellulare, moltiplicando la complessità dei fenomeni di segnalazione ed elaborazione neuronale.

La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è controllata anche all'interno di altre strutture intracellulari

La situazione di altre strutture sembra essere molto diversa da quella dell'ER e dei mitocondri, sia in termini di cinetica che per il significato biologico dei pool di calcio in essi racchiusi. Tanto a riposo quanto dopo stimolazione la $[\text{Ca}^{2+}]$ del nucleo segue da vicino la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Questi risultati sono spiegabili ammettendo che l'involucro nucleare, che è in continuità con l'ER, condivide con quest'ultimo il ruolo di store a rapido scambio, e inoltre che il complesso sistema dei pori dell'involucro nucleare non rappresenta un ostacolo al libero flusso del catione. Infine la proprietà tampone della matrice nucleare è assai più bassa di quella del citosol. L'importanza del Ca^{2+} nucleare è considerevole. Diversi fattori di trascrizione, come CREB/CBP, dipendono infatti da Ca^{2+} -calmodulina per il loro funzionamento. Altri fattori sono attivati a livello citosolico da processi Ca^{2+} -dipendenti e migrano nel nucleo solo dopo attivazione. Per dettagli su Ca^{2+} nel nucleo vedi **CD**: Approfondimento 9.8. Anche il nucleo partecipa all'omeostasi del calcio.

Una struttura che dipende dal Ca^{2+} per il suo funzionamento è il TGN. Alti livelli del catione, accumulati da una pompa diversa dalle SERCA (la *Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase*, SPCA1), sono presenti già nelle cisterne e sono successivamente accumulati nei granuli di secrezione. I granuli cromaffini, al cui interno sono presenti proteine capaci di legare il Ca^{2+} (le cromogranine e le secretogranine), contengono infatti quantità totali dell'elemento dell'ordine di 60 mmoli/litro, mentre i granuli di zimogeno del pancreas e quelli delle ghiandole salivari ne

possiedono circa la metà. Il significato di questi pool, se solo strutturale oppure scambiabile con il citosol, è stato molto discusso. Anche se una liberazione parziale non può essere esclusa, non c'è dubbio che, in questi organelli, gran parte del calcio sia destinata semplicemente a essere liberata per esocitosi insieme al resto del contenuto granulare. Anche le vescicole sinaptiche contengono calcio in quantità considerevole.

Altri organelli intracellulari che contengono calcio sono gli endosomi (che intrappolano "quanta" di catione dall'ambiente extracellulare) e anche i lisosomi (che potrebbero riceverlo dall'apparato di Golgi, come succede per i granuli di secrezione). Anche in questo caso non si possiedono informazioni certe sulla stabilità dei pool.

I pool di Ca^{2+} negli organelli hanno anche un'importanza locale

Come mai quasi tutti gli organelli cellulari contengono considerevoli pool di calcio, solo alcuni dei quali però sono rapidamente scambiabili con il citosol e utilizzabili quindi a scopi regolativi? Il calcio segregato non serve solo per gli scambi ma anche per attività locali. Così nel lume dell'ER i Ca^{2+} ioni contribuiscono ai processi di ripiegamento e assemblaggio delle proteine neosintetizzate e alla loro localizzazione dentro la cellula (devono restare nel reticolo stesso? passare nel Golgi fino alla membrana plasmatica? essere secrete?), nel TGN essi contribuiscono all'assemblaggio della matrice dei granuli di secrezione che (almeno in alcune cellule) ha una consistenza visco-elastica; nel nucleo al controllo della trascrizione e, nel lungo periodo, anche ad altri fenomeni, quali la duplicazione del DNA. Infine, nei mitocondri la captazione del Ca^{2+} serve anche al metabolismo energetico. Tre deidrogenasi del ciclo di Krebs sono infatti Ca^{2+} -dipendenti. La loro attività cresce con la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$, e per questo è importante che i mitocondri non siano organelli distinti ma siano organizzati in un reticolo, lungo il quale il Ca^{2+} può diffondere rapidamente dopo essere stato captato a livello di siti delimitati. A proposito dei mitocondri, la bassa affinità per il Ca^{2+} del loro trasportatore sembra provvidenziale. Esso permette infatti agli organelli di intervenire solo quando l'elevazione della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è notevole. Se l'affinità fosse più alta, il trasportatore funzionerebbe sempre, accumulando Ca^{2+} a spese del potenziale di membrana, con conseguente disturbo della sintesi di ATP, stress ossidativo e altri danni gravi, come avviene in condizioni patologiche.

Il Ca^{2+} nella patologia cellulare

Il Ca^{2+} copre uno spettro di funzioni più vasto di qualunque altro ione od elemento. Oscillazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ compaiono nell'uovo subito dopo la fecondazione. Inoltre aumenti modesti della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hanno un effetto protettivo, mentre aumenti incontrollati dello stesso parametro possono condurre alla morte cellulare: quindi con il Ca^{2+} si va dall'A all' Ω , e non solo simbolicamente. Poiché il mantenimento dei normali livelli di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ richiede un grosso sforzo energetico da parte della cellula,

non è sorprendente che alterazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} abbiano luogo nel corso di varie patologie cellulari, soprattutto nel sistema nervoso centrale e nel cuore. Quando l'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è persistente si registrano gravi conseguenze soprattutto a carico dei mitocondri (depolarizzazione, precipitazione di fosfato di calcio), del citoscheletro (depolverizzazione e disorganizzazione) e delle membrane. Nel sistema nervoso centrale aumenti persistenti della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con conseguente rilascio incontrollato di glutammato e attivazione anche dei recettori NMDA extrasinaptici possono condurre rapidamente alla morte neuronale (eccitotossicità) nell'area colpita, ad esempio, da ictus. I meccanismi attraverso i quali l'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induce morte cellulare rapida (minuti), in genere per morte occasionale, o necrosi, sono probabilmente molteplici. Un ruolo importante lo giocano l'attivazione di vari enzimi litici (proteasi, fosfolipasi, endonucleasi) la cui attività è Ca^{2+} -dipendente.

Le proteasi citosoliche Ca^{2+} -dipendenti costituiscono una grossa famiglia, quella delle calpaine, presenti in quasi tutti i tessuti in associazione con un loro inibitore, la calpastatina. In condizioni fisiologiche, si ritiene che le calpaine, in equilibrio con la calpastatina, partecipino alla modulazione di diversi processi cellulari come il rimangiamento del citoscheletro e della membrana cellulare, il turnover e la rimozione di recettori di membrana, l'attivazione di enzimi e la mitosi (vedi Capitolo 25).

Le fosfolipasi Ca^{2+} -attivate sono abbondanti e ubiquitarie nelle membrane cellulari. Alcune fosfolipasi A2 sono Ca^{2+} -calmodulina-dipendenti e svolgono un ruolo importante nei processi di eliminazione degli idroperossidi. Tuttavia, la loro attivazione può anche mediare risposte patologiche attraverso lisi diretta delle membrane cellulari e la generazione di metaboliti ad attività citotossica. Il ruolo del Ca^{2+} nella genesi dei danni cellulari e il coinvolgimento di meccanismi multipli e complessi nel controllo della $[\text{Ca}^{2+}]_i$, spiegano l'effetto protettivo, sia pure parziale, dimostrato da molti farmaci di tipo diverso

(Ca^{2+} antagonisti, antagonisti dei recettori glutammatergici ecc.) in fenomeni patologici di lesione cellulare, ad esempio nell'ischemia a carico del cervello e del cuore. Il problema di queste terapie è che esse devono essere somministrate prima, o al massimo immediatamente dopo l'evento patologico iniziale, una condizione in genere assai difficile o impossibile da realizzare.

In molti casi le necrosi focali, già gravi di per sé, rappresentano il processo scatenante di una lesione più ampia che si espande successivamente (ore) a zone inizialmente risparmiate (nel caso di ictus cerebrali, la cosiddetta penombra), attraverso l'attivazione di diversi meccanismi sia di segnalazione che di trascrizione genica che conducono soprattutto all'apoptosi. Una terapia adeguata dell'estensione ridurrebbe quindi moltissimo la gravità dei processi focali acuti soprattutto nel sistema nervoso centrale. L'apoptosi, o morte cellulare programmata (vedi Capitolo 27) è un processo profondamente diverso dalla necrosi, basato sull'attivazione di un programma di rapida ed efficiente autoeliminazione con digestione, condensazione e poi frammentazione dell'intera cellula. Che troppo Ca^{2+} potesse indurre apoptosi era già noto (vedi la eccitotossicità da glutammato discussa prima o l'effetto letale dei Ca^{2+} ionofori, farmaci che scambiano il catione per 2 H^+ , e che tendono quindi a dissipare i gradienti di entrambi gli ioni). Risultati recenti tendono a richiamare l'attenzione sul ruolo dei mitocondri, che, quando sono lesi dall'accumulo di Ca^{2+} , rilasciano nel citosol il citocromo C, localizzato nello spazio adiacente alla membrana interna mitocondriale (Figura 9.4D). Il citocromo C attiva (con la collaborazione della proteina Apaf-1) la cascata delle proteasi specifiche per l'apoptosi, le caspasi, sottraendole così al controllo dei loro inibitori. A questo proposito è interessante osservare che il mitocondrio e anche l'ER sono sede di importanti modulatori positivi e negativi dell'apoptosi (fattori del tipo di Bax e Bcl2, rispettivamente) la cui espressione può influenzare l'omeostasi del Ca^{2+} e anche il suo effetto pro-apoptotico.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ La concentrazione dello ione calcio libero all'interno della cellula è circa 10.000 volte più bassa rispetto a quella del liquido extracellulare. Questo gradiente è sorretto da: meccanismi tampone (proteici) intracellulari; meccanismi di estrusione (mediati da pompe e trasportatori di membrana); meccanismi che sequestrano lo ione calcio all'interno di organelli intracellulari (mediati da pompe e proteine di legame specifiche).
- ▶ Gli aumenti transitori della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sono indotti da sistemi di comunicazione cellulari e prevedono sia ingresso di calcio dall'esterno che rilascio dagli organelli. Le variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rappresentano segnali funzionali per la cellula.
- ▶ La concentrazione dello ione calcio è finemente controllata anche a livello degli organelli cellulari (in particolare mitocondri, ER e cis-Golgi) per rispondere a specifiche esigenze funzionali.
- ▶ Le alterazioni dei meccanismi di controllo delle concentrazioni intracellulari sono associate a modificazioni sostanziali della fisiologia cellulare, fino alla necrosi.

Farmacologia delle MAP chinasi

Lucia Vicentini, Maria Grazia Cattaneo

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire conoscenze sulla struttura e sulla funzione delle diverse famiglie di MAPK e sui processi cellulari regolati da queste proteine
- ▶ Conoscere le principali patologie che vedono coinvolte alterazioni nella struttura e/o nella funzione delle MAPK e delle proteine a esse correlate
- ▶ Conoscere gli sviluppi terapeutici più innovativi che hanno come bersaglio sia le MAPK che le proteine responsabili della loro regolazione

Le MAP chinasi, proteinchinasi attivate da mitogeni (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPK), sono una famiglia di enzimi coinvolta nella regolazione di importanti processi biologici quali l'espressione genica, il metabolismo, la proliferazione, la morte programmata, la sopravvivenza e la motilità cellulare. A conferma del loro fondamentale ruolo fisiologico, l'espressione e le funzioni delle MAPK sono conservate durante l'evoluzione in tutti gli eucarioti, a partire dagli organismi unicellulari fino all'uomo.

Le MAPK, una volta attivate, catalizzano l'attacco di gruppi fosfato a specifici residui di serina e treonina presenti nelle proteine bersaglio che, in seguito a questa fosforilazione, vengono stimolate o inibite nella loro attività. Queste proteine comprendono altre proteinchinasi, fattori di trascrizione, enzimi, proteine del citoscheletro, e la loro varietà è responsabile dei molteplici effetti biologici conseguenti all'attivazione delle MAPK, che sono così in grado di influenzare la quasi totalità dei processi cellulari. La pleiotropia degli effetti biologici conseguenti alla loro attivazione fa delle MAPK un importante bersaglio per lo sviluppo di farmaci innovativi per il trattamento di importanti patologie umane, quali ad esempio i tumori e le malattie infiammatorie croniche.

Le famiglie di MAPK e i loro meccanismi di attivazione

Negli organismi multicellulari sono state caratterizzate quattro principali sottofamiglie di MAPK: le *Extracellular-signal Regulated Kinases* (ERK) ERK1 ed ERK2; le *c-Jun*

NH₂-terminal Kinases (JNK) JNK1, JNK2 e JNK3; le p38 α , β , γ e δ ; la ERK5. Ognuna di queste MAPK è attivata da specifici stimoli e fosforila specifici substrati, stimolando quindi diverse funzioni cellulari.

L'attivazione delle diverse MAPK avviene secondo uno schema generale comune, che prevede una serie di fosforilazioni sequenziali a opera di diverse chinasi attivate in successione (Figura 10.1). Lo stimolo extracellulare,

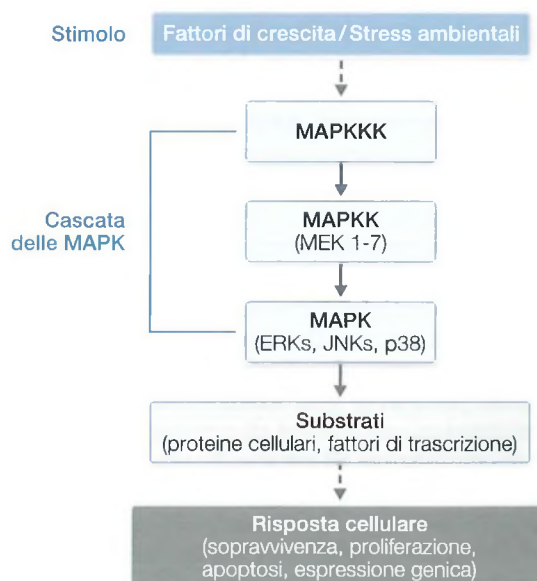


FIGURA 10.1 Cascata di attivazione delle MAPK.

attraverso una molecola attivatrice, stimola una MAPKKK (MAPK chinasi chinasi) che fosforila, in corrispondenza di specifici residui di serina e/o treonina, una MAPKK (MAPK chinasi) la quale, a sua volta, fosforila e attiva, mediante una doppia fosforilazione in tirosina e treonina, la MAPK vera e propria. Una volta attivata, la MAPK fosforila le sue proteine bersaglio, che possono essere localizzate in diverse regioni cellulari. Tra questi bersagli, vi sono infatti proteine associate alla membrana plasmatica, così come proteine citosoliche o nucleari. Il riconoscimento tra enzima e substrato si attua attraverso una doppia interazione. Tutte le MAPK riconoscono infatti innanzitutto il sito di fosforilazione, costituito da una serina o da una treonina seguite da una prolina; la piena specificità è assicurata dall'interazione tra un sito dell'enzima diverso dal sito catalitico, e un dominio specifico di riconoscimento presente sulla proteina substrato. I gruppi fosfato vengono poi rimossi sia dalle MAPK che dalle proteine substrato a opera di specifiche fosfatasi, e a questa rimozione si associa lo spegnimento del segnale. L'azione delle fosfatasi gioca quindi un ruolo fondamentale nel controllo dell'intensità e della durata delle risposte cellulari. Le principali fosfatasi coinvolte nella regolazione dell'attività delle MAPK sono discusse nel CD (vedi CD: Approfondimento 10.1. *Fosfatasi a doppia specificità come regolatori dell'attività delle MAPK*).

Le ERK

Le ERK sono coinvolte nella regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare. È stato anche dimostrato il loro coinvolgimento nei processi di differenziamento e plasticità neuronale a livello del sistema nervoso centrale (vedi CD: Approfondimento 10.2 *Le MAPK chinasi nei processi di apprendimento e memoria e loro ruolo nelle patologie del SNC*; e Approfondimenti 7.1 e 38.1). Caratteristica comune ai principali fenomeni biologici regolati dalle ERK è quindi quella di essere processi a lungo termine che richiedono la traslocazione al nucleo dell'enzima e la conseguente modulazione dell'espressione genica.

Le due isoforme ERK1 ed ERK2 sono espresse in maniera ubiquitaria e, pur essendo codificate da due geni distinti, mostrano un'elevata omologia di sequenza (84% di identità a livello amminoacidico), lo stesso motivo treonina-acido glutammico-tirosina nel sito di attivazione e la stessa specificità di substrato. Studi recenti suggeriscono che anche dal punto di vista funzionale ERK1 ed ERK2 sono equivalenti, e che è l'attività totale di entrambe le isoforme a regolare la proliferazione cellulare.

Tipici attivatori delle ERK sono i recettori ad attività tirosinchinasica per i fattori di crescita. In risposta al legame con il fattore di crescita, le tirosine recettoriali si fosforilano, venendo così a costituire un sito di reclutamento per le proteine adattatrici Shc e Grb2 (vedi Capitolo 14). La proteina Grb2 è a sua volta legata a un fattore di scambio per nucleotidi guanilici chiamato SOS. Grazie al legame recettore-Grb2 o recettore-Shc-Grb2, il complesso formato da Grb2 e SOS trasloca alla membrana

plasmatica, dove può operare lo scambio GDP/GTP sulla GTPasi monomeric Ras determinandone l'attivazione (vedi Capitolo 13).

A questo punto, Ras è in grado di legare e attivare la serina-treonina chinasi Raf (una MAPKKK) che fosforila a sua volta MEK (una MAPKK), capace di fosforilare ERK su due specifici residui di treonina e tirosina, determinandone l'attivazione (Figura 10.2). L'amplificazione del segnale attraverso questa cascata è tale per cui l'attivazione di solo il 5% delle molecole di Ras è sufficiente per ottenere la piena attivazione di ERK. Anche i recettori accoppiati alle proteine G (*G Protein Coupled Receptors*, GPCRs) sono in grado di attivare le ERK con meccanismi eterogenei, tuttora oggetto di studio (vedi CD: Approfondimento 10.3. *L'attivazione delle ERK da parte dei recettori accoppiati a G proteine*). ERK, in condizioni di riposo, è localizzata nel citoplasma, ma dopo la fosforilazione trasloca al nucleo, dove regola l'espressione genica, fosforilando, sia direttamente che indirettamente attraverso l'intervento di altre chinasi, fattori di trascrizione, co-attivatori della trascrizione e proteine associate ai cosiddetti *immediate-early genes*. Questi geni, tra i quali il più noto è c-fos, trascritti in maniera rapida e transiente dopo trattamento con i fattori di crescita, inducono a loro volta la trascrizione di geni più tardivi con il risultato di modificare il programma genetico della cellula. L'azione delle ERK si esercita anche sul sistema delle cicline e delle chinasi a esse associate (*Cyclin-Dependent Kinase*, CDK), proteine chiave nel controllo della proliferazione cellulare. In particolare, le ERK stimolano la sintesi della ciclina D1 e la sua associazione con CDK4. Il complesso ciclina D1/CDK4 è a sua volta in grado di fosforilare la proteina del retinoblastoma che, così inattivata, promuove l'attivazione del fattore E2F, anch'esso coinvolto nella trascrizione dei geni necessari per la replicazione del DNA e la crescita cellulare.

Accanto alla loro capacità di modificare il programma genetico della cellula, effetto che richiede la traslocazione al nucleo dell'enzima, le ERK stimolano la proliferazione cellulare anche attraverso altri meccanismi. La loro attivazione aumenta ad esempio la sintesi dei nucleotidi necessari per la formazione di nuove molecole di DNA e RNA, così come la sintesi proteica cellulare. L'azione stimolatoria delle ERK sulla sintesi di nuovi nucleotidi è conseguente alla fosforilazione e all'aumento di attività della carbamilfosfato sintetasi II, enzima limitante per la sintesi delle basi pirimidiniche. La capacità di ERK di stimolare la sintesi proteica dipende invece dalla fosforilazione della proteina MNK1 che, a sua volta, attiva eIF-4E, un fattore responsabile del reclutamento dei ribosomi, sede della sintesi proteica, e di fattori di inizio della traduzione. Le ERK sono inoltre in grado di facilitare la trascrizione genica modificando la struttura della cromatina e aumentando così l'accessibilità dei fattori di inizio della trascrizione. Questa facilitazione non dipende dall'attività chinasi di ERK, ma sembra invece essere mediata dalla sua interazione diretta con le proteine responsabili del rilassamento della doppia elica. L'attivazione di ERK1/2 è associata anche alla sopravvivenza cellulare sia attraverso la sua capacità di inibire l'espressione di proteine pro-apoptotiche della famiglia

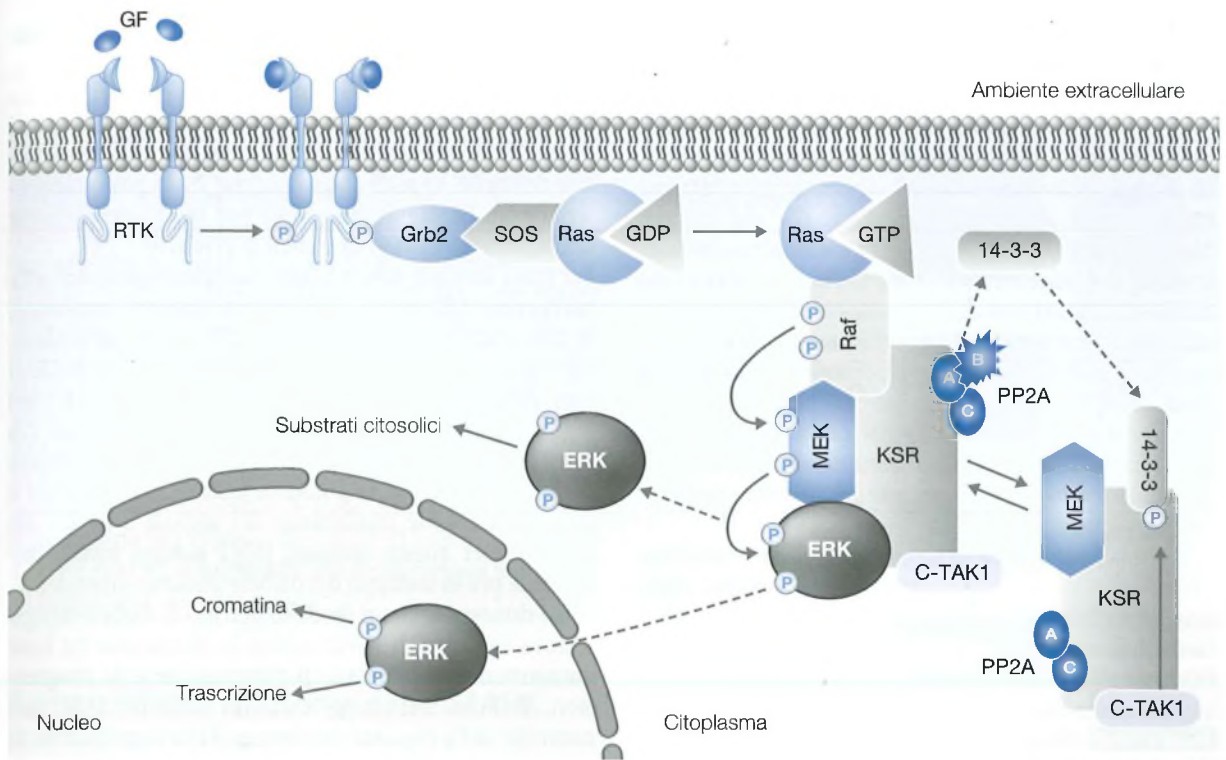


FIGURA 10.2 Attivazione di ERK da parte dei recettori per i fattori di crescita. Il legame con il fattore di crescita (GF) induce dimerizzazione e fosforilazione crociata del suo recettore (RTK). Alle tirosine fosforilate si lega, direttamente o tramite l'adattatore Shc, la proteina Grb2, responsabile del reclutamento di SOS e della conseguente attivazione di Ras che, attraverso le chinasi Raf e MEK, fosforila ERK che può a questo punto agire sui suoi substrati citosolici o nucleari. L'attivazione di Ras determina anche la traslocazione in membrana dello scaffold KSR. Nelle cellule quiescenti infatti KSR è sequestrato nel citoplasma dal legame alla proteina 14-3-3 che lega il residuo fosforilato serina 392 di KSR. Ras GTP determina la defosforilazione di questo residuo grazie al reclutamento a KSR della subunità B della fosfatasi 2A (PP2A), le cui subunità A e C sono invece costitutivamente associate a KSR. L'inattivazione di KSR richiede la ri-fosforilazione della serina 392, sito di legame per 14-3-3, da parte della chinasi C-TAK1 (Cdc25C-associated kinase-1). Alla regolazione della localizzazione di KSR partecipa anche la proteina Imp, una ubiquitina ligasi la cui degradazione, stimolata da Ras attivato, è sufficiente a indurre la traslocazione di KSR alla membrana cellulare.

Bcl-2 che attraverso altri meccanismi di regolazione. L'attivazione di ERK determina ad esempio la fosforilazione del fattore di trascrizione FOXO3a, uno dei principali fattori responsabili della trascrizione di geni pro-apoptotici che, una volta fosforilato, viene avviato alla degradazione. Anche la proteina pro-apoptotica BIM può essere fosforilata direttamente da ERK, e anche in questo caso la fosforilazione avvia BIM alla degradazione. Nel caso invece di BAD, un'altra proteina pro-apoptotica, la fosforilazione da parte di ERK ne determina il sequestro e l'inattivazione da parte della proteina 14-3-3. Un'attivazione non più regolata di ERK, come si osserva nei numerosi tumori umani portatori di mutazioni nel pathway Ras/Raf/MEK/ERK (Figura 10.3), può determinare quindi non solo la loro crescita incontrollata ma anche un'aumentata resistenza delle cellule tumorali all'apoptosi, che può contribuire sia allo sviluppo del tumore che all'instaurarsi di fenomeni di resistenza ai trattamenti chemioterapici.

Le JNK

Le JNK sono classificate come proteinchinasi attivate da stress cellulari, quali ad esempio lo shock osmotico e

l'esposizione a radiazioni ultraviolette. Possono comunque essere stimulate anche da citochine e fattori di crescita, e sono coinvolte nel controllo dell'apoptosi. Sono codificate da tre geni differenti dai quali, per splicing alternativo, si possono formare almeno dieci isoforme della proteina. Le più importanti e meglio caratterizzate dal punto di vista funzionale sono le isoforme JNK1, JNK2 e JNK3. Mentre l'espressione di JNK1 e JNK2 è ubiquitaria, JNK3 è espressa in maniera selettiva nel sistema nervoso centrale e nel cuore. Studi con animali knockout per le singole isoforme hanno dimostrato che ciascuna proteina riveste un ruolo specifico e la sua assenza non può essere vicariata dall'espressione delle altre isoforme.

La stimolazione delle JNK determina l'attivazione di diversi fattori di trascrizione, il principale dei quali è c-Jun, che viene attivato in seguito alla fosforilazione di due residui di serina a livello del suo dominio aminoterminale. Il fattore c-Jun è un componente del complesso di trascrizione AP-1, importante regolatore dell'espressione di numerosi geni (vedi Capitolo 19: Farmacologia della trascrizione genica). Tra i geni la cui trascrizione è stimolata da AP-1 vi sono geni che codificano per citochine pro-infiammatorie, l'espres-

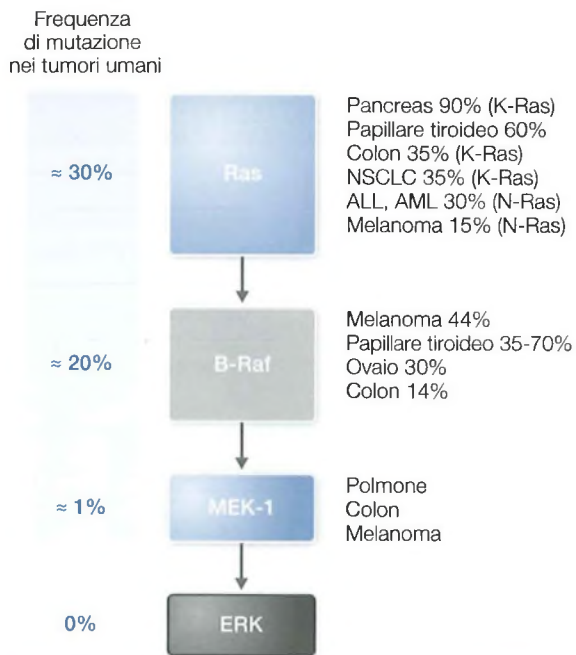


FIGURA 10.3 Alterazioni genetiche della cascata Ras/Raf/MEK/ERK nei tumori umani. Nella colonna a sinistra è mostrata la frequenza di mutazione di Ras, B-Raf e MEK-1 osservata nei tumori umani. A destra sono invece elencati i principali tipi di tumore portatori di queste mutazioni, con la percentuale nella quale è stata riscontrata la mutazione indicata. NSCLC, tumore polmonare non a piccole cellule; ALL, leucemia linfoblastica acuta; AML, leucemia mieloide acuta.

sione dei quali aumenta in risposta a stress ambientali e radiazioni, tutte condizioni note attivare le JNK. La capacità delle JNK di regolare, attraverso c-Jun e AP-1, la trascrizione di geni per citochine, e la capacità delle stesse citochine di attivare JNK, suggeriscono un loro possibile coinvolgimento nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche. Allo stesso modo, l'attivazione delle JNK induce l'espressione di geni che codificano per enzimi responsabili della degradazione di proteine della matrice extracellulare (collagenasi e metalloproteasi), responsabili dell'erosione delle cartilagini e dell'osso nell'artrite reumatoide e, più in generale, dei tessuti bersaglio in altre patologie autoimmuni.

Possono essere substrato delle JNK anche proteine cellulari, e in particolare proteine come Bcl-2 e p53, coinvolte nella morte cellulare programmata o apoptosi, descritta nel Capitolo 27: Ciclo cellulare e morte cellulare. Proteine ad attività chinasi sono state implicate sia nell'induzione che nell'esecuzione del programma apoptotico. In particolare, le JNK sono generalmente associate alla promozione dell'apoptosi. La loro attivazione sembra essere necessaria sia per il rilascio dai mitocondri di molecole pro-apoptotiche che per l'espressione di proteine della famiglia Bcl-2 necessarie per la corretta esecuzione del processo apoptotico. L'attivazione delle JNK è stata osservata ad esempio nei neuroni nel corso di eventi

ischemici, ed è stata correlata ai processi di apoptosi che portano a morte neuronale. A conferma di questo ruolo, topi knockout per JNK3, l'isoforma espressa nel sistema nervoso centrale, mostrano un'aumentata resistenza al danno neuronale indotto da agenti eccitatori o da ischemia cerebrale. Questo suggerisce che JNK3 possa rappresentare un bersaglio innovativo per la neuroprotezione farmacologica in caso di ischemia cerebrale.

Per JNK1 invece è stato proposto un coinvolgimento nella patogenesi dell'obesità e del diabete insulino-resistente, le due sindromi metaboliche più diffuse. In particolare, topi geneticamente predisposti all'obesità, i cosiddetti topi *ob/ob*, presentano elevati livelli di attività di JNK1 nel fegato, nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo. Gli stessi animali, se privati di JNK1, mostrano una diminuita tendenza all'obesità, una minore resistenza all'insulina e una più efficiente trasduzione del segnale a livello dei recettori per questo ormone. JNK2 sembra invece importante per lo sviluppo del diabete insulino-dipendente, come dimostrato in un modello murino di diabete di tipo 1 dove l'assenza di JNK2 riduce la distruzione su base autoimmune delle cellule β -pancreatiche e la progressione della malattia suggerendo un ruolo per JNK2 nel controllo della risposta autoimmunitaria responsabile di questa forma di diabete.

Le p38

Appartengono a questa sottofamiglia quattro chinasi, denominate α , β , γ e δ , codificate da quattro geni distinti e con un'omologia a livello della sequenza amminoacidica pari a circa il 60%. Dal punto di vista funzionale, esiste tra le diverse chinasi un certo grado di ridondanza, il che significa che, in assenza di una isoforma, le altre possono vicariare la sua funzione. Le p38 mostrano diverse analogie con le JNK, in quanto sono attivate anch'esse da situazioni di stress cellulare e dalla stimolazione con citochine pro-infiammatorie. Allo stesso modo, la loro attivazione induce l'espressione di numerose citochine e, più in generale, di proteine coinvolte nel processo infiammatorio, come ad esempio la ciclo ossigenasi di tipo 2 (COX-2). Anche per questa sottofamiglia di MAPK, in particolare per p38 α , è quindi possibile prevedere un ruolo nella patogenesi di malattie infiammatorie croniche dei tessuti periferici come l'artrite reumatoide. Numerosi studi suggeriscono inoltre che p38 α regoli i livelli di citochine pro-infiammatorie anche nel sistema nervoso centrale. Questa chinasi potrebbe quindi rappresentare un nuovo possibile bersaglio terapeutico in quelle patologie degenerative del sistema nervoso centrale che presentano una componente neuroinfiammatoria, come ad esempio la malattia di Alzheimer (vedi CD: Approfondimento 10.2).

Per quanto riguarda p38 δ e p38 γ , la loro espressione tessuto-specifica ne definisce la funzione: p38 δ è espressa nel pancreas dove regola la secrezione di insulina e la sopravvivenza delle cellule β , mentre p38 γ interviene a livello della muscolatura scheletrica nella regolazione dei processi di rigenerazione del muscolo nell'adulto.

ERK5

ERK5, chiamata anche BMK1 (big MAP kinase 1), è caratterizzata da una regione C-terminale di 400 amminoacidi del tutto unica, che non è presente in nessun'altra MAPK e che non mostra omologie di sequenza con alcuna proteina conosciuta. Questa regione ha un importante ruolo regolatorio sull'attività di ERK5, in quanto contiene un sito che può andare incontro ad autofosforilazione, evento che aumenta di molto la sua attività come fattore trascrizionale. Il dominio N-terminale di ERK5 mostra invece un'elevata omologia con ERK1/2, ma ciò nonostante il suo ruolo fisiologico è unico e non può essere compensato dalla presenza di ERK1/2. Infatti, animali knockout per ERK5 muoiono durante lo sviluppo embrionale per la mancata formazione di un efficiente sistema cardiovascolare. A tale proposito, è stato dimostrato che ERK5 è necessaria per l'azione del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), il principale fattore di crescita che regola la formazione dei vasi sanguigni.

La specificità d'azione delle MAPK

Come descritto nei paragrafi precedenti, ciascuna MAPK è coinvolta nel controllo di diversi e talvolta opposti eventi cellulari. È quindi necessario identificare quali meccanismi regolano nei diversi contesti la specificità del segnale generato dall'attivazione delle MAPK, soprattutto alla luce del fatto che le sequenze consenso per la fosforilazione e i domini che regolano la loro interazione con altre proteine sono molto simili nelle diverse MAPK.

Tra i determinanti della specificità sono comprese:

1. la durata d'azione;
2. l'esistenza di isoforme multiple;
3. le interazioni con proteine scaffold;
4. la localizzazione subcellulare.

Durata d'azione

La durata e l'intensità del segnale sono state il primo meccanismo proposto per spiegare la specificità di segnale delle MAPK grazie agli studi condotti nelle cellule PC12, un modello cellulare derivato da feocromocitoma di ratto, un tumore della midollare del surrene. In queste cellule, EGF (*Epidermal Growth Factor*) e NGF (*Nerve Growth Factor*), pur attivando entrambi le ERK in seguito al legame con gli specifici recettori ad attività tirosinchinasi, inducono una differente risposta biologica: mentre l'EGF stimola la proliferazione delle cellule PC12, l'NGF agisce come stimolo differenziativo, con la comparsa di un fenotipo neuronale, caratterizzato dall'estensione di neuriti e dall'espressione di tipici marker neuronali. La specificità del segnale, la capacità cioè di indurre proliferazione o differenziamento, sembra essere determinata dalla durata d'azione delle ERK. Infatti, mentre l'EGF induce una fosforilazione rapida e transiente dell'enzima, nel caso dell'NGF la stimolazione di ERK è bifasica, comprende cioè una prima fase rapida di attivazione e una seconda fase più prolungata nel tempo. Studi recenti hanno dimo-

strato che, mentre l'attivazione transiente di ERK dipende dal pathway Ras/ERK, l'attivazione prolungata richiede l'attivazione di un'altra GTPasi monometrica, Rap 1, che nelle cellule PC12 è attivata dal solo NGF.

Il caso delle cellule di feocromocitoma, dove una stimolazione prolungata delle ERK si traduce in un segnale differenziativo, non è però un caso generale. In altri contesti cellulari, come ad esempio i fibroblasti, una prolungata attivazione delle ERK è responsabile degli effetti proliferativi dei fattori di crescita. Infatti, una attivazione transiente delle ERK si osserva anche con sostanze che non stimolano la divisione cellulare. Solo nel caso dei fattori di crescita, al primo picco di attività segue un secondo picco, meno pronunciato ma più lento, che dura fino a 6 ore dalla stimolazione. Il contesto cellulare contribuisce quindi anch'esso alla determinazione della risposta biologica.

Isoforme multiple dei componenti della cascata delle MAPK

Nella cascata che porta all'attivazione delle MAPK sono state descritte a ogni livello multiple isoforme delle diverse proteine coinvolte. Un esempio è quello delle MAPKKK nella cascata di attivazione delle ERK, che comprendono tra le altre le isoforme A-Raf, B-Raf, Raf-1, c-Mos, TPL2 e MEKK1, ciascuna delle quali opera in diverse condizioni, aumentando così la molteplicità e la specificità di azione nei diversi contesti fisiologici.

Interazioni con proteine scaffold

Le proteine scaffold permettono la formazione di complessi multimolecolari importanti per la regolazione spaziale e temporale dell'attività delle MAPK. Legandosi alle diverse proteine che compongono la cascata, gli scaffold sono innanzitutto in grado di mantenerle in stretta associazione, favorendo in questo modo un'efficiente propagazione del segnale. Inducono inoltre anche il reclutamento di altre proteine (sia proteine bersaglio che ad attività regolatoria) e stabilizzano le MAPK proteggendole dall'azione delle fosfatasi. Tra le proteine scaffold coinvolte nella regolazione dell'attività delle MAPK, una tra le meglio caratterizzate è KSR (*Kinase Suppressor of Ras*), che può legare Raf, MEK ed ERK (Figura 10.2). Mentre MEK è costitutivamente associata a KSR, ERK si lega solo in risposta a uno stimolo attivante. Il ruolo centrale di KSR nella regolazione di ERK è stato dimostrato in vitro e in vivo in diversi organismi. In particolare, la comparsa di tumori cutanei indotta dall'espressione di una forma mutata di Ras, e dipendente quindi dall'attivazione del pathway Ras/ERK, è completamente inibita in topi knockout per KSR. Questo risultato permette di ipotizzare che le proteine scaffold possano rappresentare un interessante bersaglio terapeutico per un approccio innovativo al trattamento dei tumori.

Localizzazione subcellulare

I segnali primari che portano all'attivazione delle MAPK sono tipicamente generati a livello della membrana cellulare, dove sono presenti i recettori che ricevono gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno. Il citoplasma è invece

la sede dove sono localizzati, in condizioni di riposo, i diversi componenti della cascata. Dopo la stimolazione, tutti modificano la loro localizzazione, direzionandosi a diversi compartimenti cellulari, dove incontreranno i substrati specifici per la determinazione dell'effetto fisiologico finale, appropriato allo stimolo ricevuto. Le ERK ad esempio, in cellule a riposo, sono localizzate nel citoplasma, trattenute dal loro legame a proteine di ancoraggio. Questo legame è reversibile e, infatti, dopo stimolazione con un fattore di crescita, il 60-70% delle molecole di ERK trasloca al nucleo dove può svolgere il suo ruolo di regolatore della trascrizione genica. È stato dimostrato che il trasferimento di ERK al nucleo dipende dalla presenza di una sequenza di traslocazione nucleare che, una volta fosforilata in seguito all'attivazione dell'enzima, ne permette l'interazione con la proteina importin7, che media l'ingresso di ERK nel nucleo attraverso i pori nucleari. Un ruolo importante nella localizzazione subcellulare delle MAPK è svolto anche dalle proteine scaffold, come ad esempio la β -arrestina. Questa proteina, oltre a regolare l'attività dei GPCR (vedi Capitolo 13), funziona anche come scaffold in risposta alla stimolazione recettoriale reclutando, accanto al recettore, anche Raf, MEK ed ERK. L'associazione con la β -arrestina previene la traslocazione di ERK al nucleo, inibendo la sua attività regolatoria sulla trascrizione e favorendo invece l'interazione con le proteine bersaglio citosoliche. Il controllo della localizzazione subcellulare attraverso proteine scaffold è quindi una strategia che la cellula può utilizzare per regolare in modo selettivo le risposte biologiche dipendenti dall'attivazione delle MAPK.

Inibizione farmacologica delle MAPK

Il ruolo centrale delle MAPK nella regolazione di molteplici risposte cellulari fa di questi enzimi un interessante bersaglio farmacologico, e negli ultimi anni sono state sviluppate numerose molecole in grado di inibire selettivamente i membri delle diverse famiglie. Ovviamente, il campo di maggiore interesse è quello oncologico; ma, data la giovane età scientifica delle MAPK, l'utilizzo di gran parte dei farmaci a oggi disponibili è ancora limitato al laboratorio, e solo per alcuni è iniziata la sperimentazione clinica.

Ras/Raf/MEK/ERK

La cascata Ras/Raf/MEK/ERK è la via di segnalazione più frequentemente alterata nei tumori umani. Mutazioni attivanti a carico di Ras sono presenti in circa il 30% dei tumori e, più recentemente, sono state descritte mutazioni attivanti nel dominio chinasi di B-Raf nel 20% circa dei tumori, con una percentuale che sale al 40% nei melanomi (Figura 10.3). Queste mutazioni determinano l'attivazione persistente di ERK1/2, che contribuisce così in maniera non più regolata alla crescita tumorale. Farmaci inibitori della via delle ERK sono quindi candidati come possibili agenti antitumorali.

Nel caso di Ras, nonostante un certo interesse iniziale suscitato dagli inibitori della farnesiltransferasi, che impediscono la sua localizzazione in membrana bloccando la sua capacità di attivare le proteine effettrici, non sono stati ancora identificati inibitori dotati di efficacia clinica. Nel caso di ERK non sono disponibili inibitori diretti della sua attività, ma sono stati identificati diversi farmaci che inibiscono selettivamente MEK, la chinasi responsabile della sua fosforilazione e attivazione. Resta però di difficile valutazione il loro effetto sui tumori umani, in quanto i promettenti risultati ottenuti nei modelli animali non sono stati confermati in diversi studi di fase I e II dove si sono osservate risposte sporadiche in un numero estremamente limitato di pazienti. Attualmente, sono oggetto di studi di fase I e/o II alcuni nuovi inibitori di MEK (Tabella 10.1) che risultano meglio tollerati e con minori effetti collaterali. Più promettenti sono invece i risultati ottenuti con gli inibitori di Raf, anche se il sorafenib, approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) per il trattamento del carcinoma renale ed epatocellulare, e inizialmente sviluppato come inibitore di Raf, deve la sua attività biologica alla capacità di bloccare la formazione dei vasi sanguigni del tumore, agendo su target cellulari diversi da Raf. Buoni risultati nel trattamento del melanoma sono stati recentemente ottenuti in fase I con PLX4032, che inibisce esclusivamente la crescita delle cellule che esprimono la più comune mutazione attivante di B-Raf (V600E). Questo suggerisce che presupposto necessario alla risposta clinica sono le caratteristiche specifiche di ciascun tumore, il cui contesto genetico va attentamente valutato per pianificare una possibile terapia. In futuro, nuovi farmaci antitumorali che interferiscono con la cascata delle ERK potranno essere suggeriti dallo studio delle "interazioni letali", dall'identificazione cioè di quei bersagli che, se assenti o mutati nella cellula già portatrice della mutazione di Ras, risultano letali per la cellula che esprime entrambe le alterazioni. Questo innovativo approccio ha permesso di individuare tra le altre una relazione di letalità tra K-Ras e la proteina del ciclo cellulare CDK4: in un modello di tumore polmonare con K-Ras mutato, il contemporaneo silenziamento di CDK4 così come il trattamento con farmaci inibitori della chinasi ha bloccato la progressione del tumore.

TABELLA 10.1 Inibitori di MEK 1/2*

Farmaco	Fase dello studio
AZD6244	Fase II
GCD-0973	Fase I
RDEA119	Fase I/II
GSK1120212	Fase I/II
AZD8330	Fase I
RO5126766	Fase I
TAK-733	Fase I
AS703026	Fase I

* Sono riportati i farmaci inibitori di MEK 1/2 attualmente in fase di valutazione in diversi trial clinici.

JNK

Gli studi con animali knockout hanno dimostrato che ciascun enzima della famiglia delle JNK possiede uniche e specifiche funzioni, il che suggerisce la necessità di identificare farmaci il più possibile selettivi per le singole isoforme. Disporre ad esempio di un inibitore specifico per JNK3 potrebbe aprire interessanti prospettive terapeutiche nel trattamento dell'ischemia cerebrale, mentre un inibitore di JNK1 potrebbe essere utile per la prevenzione del diabete di tipo 2. Nonostante alcuni promettenti risultati in modelli preclinici di ischemia e di diabete, risultati clinici significativi non sono stati tuttavia ancora ottenuti con i farmaci inibitori delle JNK. Accanto ai farmaci più tradizionali che agiscono come competitori nel legame dell'ATP al sito attivo della chinasi, è stata recentemente sviluppata una nuova classe di farmaci disegnati sulla sequenza minima inibitoria della proteina JIP1, una proteina scaffold che inibisce l'attività di JNK. Il capostipite di questa nuova classe di farmaci, il peptide D-JNKI-1, ha mostrato, sia a livello neuronale che non neuronale, un interessante potenziale terapeutico, anche se limitato per ora a studi in vitro e a modelli animali.

p38

Il coinvolgimento di p38 nella produzione di citochine pro-infiammatorie, e quindi nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche, ha determinato lo sviluppo di numerosi farmaci inibitori della sua attività. Nonostante la loro efficacia in diversi modelli animali di artrite reumatoide (AR), i risultati ottenuti nei trial clinici sono stati però molto modesti. Il loro sviluppo è stato fortemente limitato anche dalla comparsa di seri problemi tossicologici, soprattutto a livello epatico, al punto che nessuno dei circa 22 inibitori di p38 testati in fase I e II ha raggiunto la fase III. Anche i farmaci più recenti, pur dotati di minore tossicità, non hanno dato i risultati sperati nel trattamento dell'AR in diversi trial clinici. Tra questi farmaci, ARRY-797 si è dimostrato molto efficace nel ridurre il dolore dentale postoperatorio, aprendo quindi nuove prospettive di sviluppo per gli inibitori di p38 come farmaci analgesici.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Le MAPK svolgono un ruolo cruciale nella regolazione di un gran numero di processi cellulari, che comprendono tra gli altri la proliferazione, il differenziamento, la sopravvivenza cellulare, la plasticità neuronale.
- ▶ Negli ultimi anni l'impiego di animali knockout per le diverse MAPK ha permesso di identificare con sempre maggiore chiarezza il ruolo centrale delle singole proteine in numerosi processi fisiologici e patologici.
- ▶ La pleiotropia degli effetti biologici conseguenti alla loro attivazione fa delle MAPK un importante bersaglio per lo sviluppo di farmaci innovativi per il trattamento di importanti patologie umane, quali ad esempio i tumori e le malattie infiammatorie croniche.

Bibliografia essenziale

- ▶ Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys Acta* 2010;1804:463-75.
- ▶ Brown MD, Sacks DB. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal* 2009;21:462-9.
- ▶ Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 2010;429:403-17.
- ▶ Frémin C, Meloche S. From basic research to clinical development of MEK1/2 inhibitors for cancer therapy. *J Hematol Oncol* 2010;3:8-18.
- ▶ Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signalling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 2010;661:3-38.
- ▶ Pratilas CA, Solit DB. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway: physiological feedback and drug response. *Clin Cancer Res* 2010;16:3329-34.

Aspetti integrati della trasduzione intracellulare dei segnali recettoriali

CAPITOLO

11

Jacopo Meldolesi

Obiettivi formativi

- Comprendere che in vivo l'omeostasi delle cellule è regolata dall'attività simultanea di molteplici recettori le cui segnalazioni spesso si influenzano reciprocamente (cross talk)
- Tenere presente come ogni intervento farmacologico indirizzato a recettori o a cascate intracellulari di segnalazione possa influenzare l'omeostasi della cellula non solo a livello del suo settore specifico ma anche in termini complessivi
- Ricordare che gli effetti dei farmaci indirizzati a recettori, anche se talvolta inattesi o apparentemente incongrui, dipendono comunque molto spesso da meccanismi specifici della trasduzione, che nel caso di molti recettori sono molteplici e possono variare da cellula a cellula

Nella tradizione della Farmacologia recettoriale la segnalazione indotta dall'attivazione dei vari gruppi di recettori è inevitabilmente trattata in capitoli diversi che sottolineano la specificità della trasduzione e le caratteristiche distinte dei vari processi considerati di maggiore interesse, quali la rapidità per i canali, la molteplicità di segnalazione per i recettori accoppiati alle G proteine (GPCRs), la lentezza per quelli che inducono modifiche della proliferazione cellulare o dell'espressione genica. Naturalmente tutte queste caratteristiche dei recettori sono corrette. Esse però non prendono in considerazione le molteplici eccezioni che esistono a questa classificazione e non illustrano l'intero significato trasduzionale e fisiologico dei vari recettori. Intendiamo riconsiderare questi problemi cercando di metterci da un punto di vista più complessivo, cercando cioè di mostrare quello che succede realmente in una cellula che, esprimendo numerosi recettori, è sottoposta a un continuo "bombardamento", seppure di intensità variabile, da parte dei loro agonisti. Data la complessità del problema, il nostro quadro non potrà essere completo, in particolare non potrà tenere conto delle differenze pressoché infinite che esistono tra le cellule in tema di segnalazione. Queste differenze sono dovute soprattutto alle lunghe strade (le cosiddette cascate) che, partendo dall'attivazione recettoriale, conducono fino alle risposte funzionali. Ci limiteremo ad ampliare il quadro della presentazione, passando dall'approccio focalizzato sulle cose più frequenti, tipico della ricerca biomedica, a una visione più integrata sostenuta da specifici esempi.

Dualismo recettoriale nucleo/citoplasma

Da sempre sappiamo che singoli agonisti possono avere effetti diversi non solo quando attivano recettori diversi, magari nella stessa cellula (ad esempio, recettori α e β -adrenergici nella muscolatura liscia vasale), o quando attivano recettori simili, se non uguali, in cellule diverse (ad esempio, recettori β nel cuore e nei vasi). L'eterogeneità può includere recettori di tipo diverso. Che l'acetilcolina, la serotonina, il glutammato o il GABA possano attivare sia canali che GPCRs è ben noto. Si tratta comunque in tutti i casi di recettori di superficie. Sembrava invece che singoli agonisti non potessero attivare sia recettori di superficie che recettori nucleari che funzionano da fattori di trascrizione. Questa "chiusura" sembra ormai caduta. Il caso più solido è quello dei recettori degli steroidi, attivati dal legame con i loro ormoni idrofobici o nel citoplasma o direttamente nel nucleo delle cellule dove funzionano come fattori di trascrizione (vedi Capitoli 6 e 20). Un meccanismo d'azione trascrizionale richiede tempo, sia perché deve essere trasdotto in termini di sintesi proteica, sia perché il suo effetto diviene apprezzabile solo quando l'aumento o la diminuzione della sintesi hanno modificato significativamente il livello delle proteine bersaglio. Eppure non solo moltissimi risultati, ottenuti già agli albori della endocrinologia molecolare, ma anche la pratica clinica avevano dimostrato che, accanto alle classiche risposte trascrizionali tardive, esistono risposte rapide agli steroidi che coinvolgono vari meccanismi trasduzionali,

quali il Ca^{2+} , tirosin chinasi (come *Srk*), treonina/serina chinasi (come le MAP chinasi) e altri. Oggi si sa che questi risultati dipendono da recettori extranucleari localizzati, almeno in parte, a livello della membrana plasmatica. La natura di questi recettori è discussa. Alcuni ritengono che possa trattarsi di GPCRs, altri che si tratti degli stessi recettori nucleari che, dopo essere stati palmitoilati, sono indirizzati ai rafts della membrana plasmatica. In questo caso i recettori legherebbero i loro ormoni alla faccia citosolica della membrana, attivando una trasduzione rapida, diversa da quella classica, impossibile nell'ambiente nucleare. Questo dualismo non sembra specifico degli steroidi. Al contrario cominciano a emergere esempi di dualismo "in senso inverso". Vari agonisti recettoriali idrofobici, come le prostaglandine (vedi Capitolo 44) e gli endocannabinoidi (vedi Capitolo 42), sono noti finora per attivare GPCR di superficie. In questi casi, però, comincia a essere riportata l'esistenza, accanto ai GPCR che predominano, anche di recettori nucleari trascrizionali. Nel complesso, il dualismo recettoriale nucleo/superficie potrebbe sembrare non così diverso dalla trasduzione di molti recettori di superficie che finiscono per modificare la trascrizione attraverso la generazione di secondi messaggeri. L'esempio migliore è forse quello dei fattori di crescita a tirosina chinasi (vedi Capitolo 14) che, oltre a molteplici segnali citoplasmatici, fosforilano i fattori di trascrizione STAT che così si ridistribuiscono e funzionano nel nucleo. Nel caso della famiglia del $TGF\beta$, che sono serina/treonina chinasi, la trasduzione si riteneva avvenisse soltanto attraverso la fosforilazione un altro gruppo di fattori di crescita, gli Smads. Negli ultimi anni, però, a questa trasduzione se ne sono aggiunte anche altre, tipiche dei fattori di crescita: MAP chinasi, Rho, PI3 chinasi. Infine la trascrizione è regolata anche da recettori che agiscono via classici secondi messaggeri: cAMP (vedi Capitolo 13) o Ca^{2+} (vedi Capitolo 8), oppure attraverso MAP chinasi (vedi Capitolo 10) ecc. Nel caso del dualismo recettoriale nucleo/superficie, però, l'attivazione avviene direttamente e contemporaneamente su due recettori distinti, senza interposizione di messaggeri trasduttivi e quindi con proprietà almeno concettualmente diverse.

Eterogeneità dell'assemblaggio recettoriale

L'eterogeneità delle risposte può dipendere anche dall'assemblaggio recettoriale. Prendiamo ad esempio $p75^{NTR}$, il primo recettore identificato per le neurotrofine (NGF e altre), espresso soprattutto da neuroni e cellule neuroendocrine (vedi CD: Approfondimento 11.1. *Le neurotrofine*). $p75^{NTR}$ appartiene alla superfamiglia dei recettori del TNF. Come loro passa la membrana solo una volta e non ha attività enzimatica. Per la sua struttura e dopo interazione con un co-recettore, la sortilina, il $p75^{NTR}$ funziona come un recettore di morte. Però nelle cellule che co-esprimono anche uno o più recettori ad alta affinità delle neurotrofine, quelli forniti di tirosinchinasi detti *Trk*, $p75^{NTR}$ si lega preferenzialmente a questi ultimi e funziona come un

modulatore positivo dell'effetto neurotrofico, contribuisce cioè a indurre la sopravvivenza e il differenziamento delle cellule nervose. Nel caso del $p75^{NTR}$, quindi, la specificità di funzione non è fissa. Al contrario, l'interazione con co-recettori diversi può indurre effetti opposti. Fisiologicamente essi sono entrambi importanti, in momenti diversi, per il sistema nervoso, ma possono diventare critici nel corso di patologie. Recentemente si è scoperto che il recettore $p75^{NTR}$ /sortilina è attivato soprattutto dai precursori delle neurotrofine, il $p75^{NTR}$ /trk dalle neurotrofine mature. La cellula che libera l'agonista sceglie quindi il destino del suo bersaglio, vita o morte, procedendo o meno alla maturazione delle sue neurotrofine. Il complesso proNGF/ $p75^{NTR}$ /sortilina, poiché sembra accumularsi nel corso di processi neurodegenerativi, viene oggi studiato come bersaglio di una terapia innovativa delle malattie di Parkinson e di Alzheimer.

L'eterogeneità di assemblaggio/risposta non è una bizzarria del $p75^{NTR}$ e delle cellule nervose. Risultati analoghi sono stati ottenuti, in cellule non nervose, con classici recettori delle citochine (vedi Capitolo 15), ad esempio con TNFR1, capace di indurre morte o sopravvivenza a seconda della proteina trasduttiva (TRAF2 o FADD) legata in seguito alla sua stimolazione. Un caso particolare è quello di Wnt, una glicoproteina che agisce tramite GPCRs recettori denominati frizzled, di grande importanza durante lo sviluppo, che mantiene però ruoli essenziali anche nella fisiologia e nella patologia di vari organi, compresi il cervello e il cuore (vedi CD: Approfondimento 11.2. *Wnt e Hedgehog come possibili bersagli di farmaci*). Fino a poco tempo fa la complessità di segnalazione di Wnt, che include una via cosiddetta canonica basata sull'attivazione della trascrizione dipendente dalla β -catenina e almeno due vie non canoniche, veniva attribuita alla molteplicità di ligandi e dei recettori. Oggi è chiaro che effetti canonici e non canonici di Wnt, i primi mediati da un complesso specifico associato a frizzled, che va incontro a endocitosi, gli altri da G proteine trimeriche o piccole GTPasi, possono essere indotti anche dall'attivazione di singoli recettori attraverso il coinvolgimento di complessi trasduttivi molteplici (vedi CD: Approfondimento 11.2).

Le cascate dei segnali trasduttivi dipendono spesso dalla collaborazione (cross talk) o dalla complementazione tra recettori

In vivo le cellule ricevono un continuo bombardamento di segnali di intensità diversa, da quelli subliminali o deboli fino a quelli forti. In base a questi segnali le cellule elaborano le loro risposte e inoltre riaggiustano continuamente il loro patrimonio recettoriale. In condizioni fisiologiche la maggior parte delle risposte non è dovuta all'attivazione di un singolo recettore ma all'interazione tra recettori diversi, attivati contemporaneamente. L'interazione tra recettori contribuisce in modo significativo alla segnalazione complessiva e inoltre gioca un ruolo importante a livello di espressione genica. Questa "collaborazione" tra recettori viene comunemente definita cross talk. Per avere un'idea della situazione basta pensare

alla trasduzione dei GPCR, dalla loro dimerizzazione omologa o eterologa fino alla loro fosforilazione da parte delle GRK, l'interazione con l'arrestina ecc., tutti eventi comuni a molti recettori e quindi possibili bersagli della loro cross-talk. Altri esempi importanti sono le fosforilazioni di recettori da parte di chinasi, come PKA, CAMK II, PKC, attivate dalla trasduzione di altri recettori; il potenziamento nel cuore dei canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti di tipo L da parte della PKA, attraverso cui il recettore β -adrenergico aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ e collabora così con il recettore α_1 che libera il Ca^{2+} dal reticolo; oppure la collaborazione tra recettori degli steroidi associati con la membrana plasmatica e recettori di fattori di crescita, che si realizza via tirosina chinasi *Srk*. Un ultimo esempio è quello dei due tipi di recettori glutammatergici, i GPCRs che agiscono attraverso l'attivazione dell'idrolisi del PIP_2 e i canali, nella fattispecie il recettore NMDA che aumenta l'influsso di Ca^{2+} . Nelle spine postsinaptiche è concentrata una proteina, la neurogranina, che lega e tiene inattiva la calmodulina. L'attivazione della PKC che segue l'attivazione dei GPCR glutammatergici induce una fosforilazione della neurogranina con conseguente liberazione della calmodulina che, in presenza di alta $[Ca^{2+}]_i$ conseguente all'attivazione dei recettori NMDA, induce l'attivazione della CAMK II, contribuendo in modo essenziale all'instaurarsi del potenziamento a lungo termine. Naturalmente la cross talk partecipa anche alle risposte da farmaci che, attraverso il blocco o la stimolazione di singoli recettori, modificano anche la segnalazione in corso da parte di altri recettori "collaboranti".

Nel caso di risposte recettoriali che richiedono tempi lunghi, risultato di complesse cascate di segnalazione, le interazioni tra i processi trasduttivi possono essere assai complesse. Come esempio consideriamo il differenziamento delle cellule nervose, studiato il più spesso, ma non solo, in una linea cellulare chiamata PC12, simile alle cellule cromaffini della midollare del surrene. Da oltre 40 anni la neurotrofina NGF (vedi CD: Approfondimento 11.1) viene usata per indurre il differenziamento simil-neuronale delle PC12. Questo differenziamento consiste nella crescita di diversi neuriti (che in queste cellule, a differenza dei neuroni, non si trasformano poi in assoni e dendriti), nel blocco della proliferazione, nell'aumento del volume cellulare, dei canali voltaggio dipendenti, di recettori e di altre proteine neurospecifiche; nell'aumento numerico delle vescicole neuroendocrine, sia chiare che e a contenuto denso. Questo cambiamento fenotipico, che può essere indotto anche da altre neurotrofine, richiede tempo: diviene apprezzabile dopo 12-24 ore e si completa in 3-4 giorni. Invece vari fattori di crescita come l'EGF, che pure sono anch'essi attivatori di recettori a tirosinchinasi come le neurotrofine, hanno effetto il più spesso opposto, stimolano cioè la proliferazione. Sorprendentemente, l'attivazione di chinasi come *Srk*, o di GTPasi come *Ras*, rinforzano entrambe le risposte, sia quella proliferativa da EGF che quella differenziativa da NGF. La risposta differenziativa non è specifica solo delle neurotrofine. Può essere indotta anche dall'attivazione di proteine di adesione, come *L1CAM*, oppure da peptidi

della famiglia della secretina, quali il peptide intestinale vasoattivo (VIP) e soprattutto il peptide dell'ipofisi che attiva l'adenilato ciclasi (PACAP), i cui recettori sono accoppiati all'adenilato ciclasi. Agonisti di altri recettori con lo stesso accoppiamento, oppure la semplice attivazione della proteinchinasi A non inducono invece alcun effetto differenziativo.

Per spiegare risultati apparentemente così contraddittori bisogna ampliare un po' il nostro angolo di interpretazione. Il differenziamento dipende dall'integrazione di una serie di processi. La crescita dei neuriti, così come (nei neuroni) la crescita degli assoni, richiede l'aumento della superficie cellulare, sostenuto dalla esocitosi di specifiche vescicole non-secretive, associata alla riorganizzazione del citoscheletro, all'aumento di canali, recettori ecc. Tutto questo è dovuto alla trascrizione di numerosi geni. Per stimolare in modo integrato risposte di questo tipo sono necessarie, da un lato, cellule come quelle nervose fornite, almeno potenzialmente, di vescicole e di meccanismi appropriati per la dinamica del citoscheletro nonché di una adeguata pianificazione dell'espressione genica; dall'altro lato, risposte recettoriali adeguate in termini sia qualitativi che quantitativi. Ad esempio, la fosforilazione in tirosina di *TrkA*, e i conseguenti segnali indotti da NGF, prolungati assai più di quelli da EGF, sono necessari per attivare le piccole GTPasi *Rac1* e *cdc42* necessarie per l'esocitosi e per la riorganizzazione del citoscheletro. PACAP è attiva, in modo indipendente dalla PKA, una piccola GTPasi diversa da *Ras*, *Rit*, attraverso cui diviene possibile l'azione di diverse MAPKs a livello nucleare. NGF e PACAP non inducono differenziamenti identici. Le PC12 trattate con NGF mostrano infatti più neuriti, quelle trattate con PACAP più vescicole dense. Quindi i due agenti, funzionando attraverso cascate di segnalazione diverse, hanno entrambi un effetto differenziativo, che però presenta aspetti di almeno potenziale complementarietà.

Un quadro trasduttivo complessivo: da GSK3 ad AKT e mTOR

A questo punto, invece di presentare una singola cascata di segnali, come viene spesso fatto, ricostruiremo un quadro complessivo che include varie cascate. Nella realtà della cellula, infatti, queste cascate non funzionano separatamente ma sono strettamente integrate tra loro. Il quadro è di fondamentale importanza tanto fisiologica che patologica e farmacologica dato che governa un gran numero di funzioni chiave, essenziali in tutte le cellule: ciclo cellulare, proliferazione, differenziamento, apoptosi, sopravvivenza cellulare, metabolismo, migrazione ecc. In termini di patologia il quadro è importante per tumori, infiammazione, neurodegenerazione ecc. Le tre proteine GSK3, AKT e mTOR sono tutte serina/treonina chinasi, caratterizzate però da proprietà diverse. GSK3, a differenza di molte altre chinasi, agisce in modo costitutivo, cioè non è attivata, ma piuttosto è inibita dalla stimolazione cellulare. Le fosforilazioni dei suoi bersagli, quindi, tendono a mantenerli inattivi. AKT (altrimenti detta proteinchinasi B, PKB) è uno snodo chiave della cascata dei fattori di crescita e, inoltre, governa segnali che originano da proteine di

adesione, recettori di citochine e anche da GPCR. mTOR si integra in due complessi distinti, mTORC1 ed mTORC2, attraverso cui induce effetti diversi, quali la crescita e il differenziamento cellulare (Figura 11.1).

L'attivazione di AKT avviene tramite la generazione del fosfatidilinositolo 3,4,5-trisfosfato (PIP₃) da parte della PI3 chinasi e la successiva fosforilazione da parte della chinasi1 dipendente da fosfoinositidi (PDK1). Una volta attivata, AKT fosforila un gran numero di bersagli, molti dei quali di grande importanza (ad esempio: Bad e caspasi 9 per bloccare l'apoptosi; trasportatori del glucosio; fattori di trascrizione come CREB; enzimi del metabolismo ecc.). Qui ci focalizzeremo sull'inibizione, da parte di AKT, di due proteine chiave: GSK3 e TSC2. GSK3 è una chinasi costitutivamente attiva inibita da almeno 3 vie importanti: da AKT, MAP chinasi e (attraverso la stimolazione della sua endocitosi; vedi CD: Approfondimento 11.2) dishvelled, il messaggero della via canonica di Wnt. L'inibizione di GSK3 diminuisce il turnover di una proteina multifunzionale di grande importanza, la β -catenina, che così, oltre che nel citoplasma (giunzioni) si può accumulare nel nucleo dove induce la trascrizione di numerosi geni tra cui alcuni oncogeni, come cMyc e ciclina D1 (vedi CD: Approfondimento 11.2). TSC2 (accoppiato con TSC1) è una GAP che, a sua volta, inibisce una piccola GTPasi chiamata Rheb, il fisiologico attivatore di mTORC1. Quindi se AKT è attivata sarà attivo anche mTORC1, in grado, tra l'altro, di stimolare la sintesi proteica. Questo risultato, insieme all'espressione degli oncogeni indotta dalla β -catenina, stimolerà la proliferazione cellulare. Al contrario, se TSC2 sarà attivato, esso indurrà, oltre che l'inibizione di mTORC1, anche l'attivazione di GSK3, con conseguente riduzione della β -catenina nel nucleo, nonché l'attivazione del secondo mTORC, mTORC2, con conseguente differenziamento cellulare dipendente sia da processi citoplasmatici (mediati da piccole GTPasi, come Rac) che da fattori di trascrizione come il Forkhead box O (FOXO) (Figura 11.1).

Prospettive di sviluppo di nuovi farmaci e nuove terapie

Sono stati illustrati alcuni esempi che documentano come le basi della Farmacologia recettoriale siano più complesse di quanto spesso si dica, almeno a livello didattico. Da un punto di vista scientifico i nostri esempi, e i moltissimi altri che si potrebbero fare, aprono certamente interessanti prospettive. Tra queste esistono anche le prospettive per lo sviluppo di nuovi farmaci, o per l'associazione tra farmaci, interessanti da un punto di vista terapeutico. Lo stato attuale della ricerca, oggi molto attiva, e i considerevoli investimenti già fatti o attesi nel prossimo futuro, non lasciano dubbi in proposito. Come al solito, prospettive di questo tipo richiedono una approfondita elaborazione, sia concettuale che operativa, a partire da idee originali nate dai risultati della ricerca di base. Consideriamo alcuni possibili sviluppi.

Il mistero del p75^{NTR}, capace di indurre due effetti opposti, l'apoptosi o la sopravvivenza delle cellule nervose, è stato spiegato in due tempi, dimostrando dapprima il suo assemblaggio differenziale (con la sortilina nel primo caso, con i recettori Trk nel secondo), successivamente la sua diversa specificità di attivazione (con i precursori delle neurotrofine nel primo caso, con le neurotrofine mature nel secondo). Subito dopo è stato dimostrato che, nella malattia di Alzheimer, il p75^{NTR} è legato soprattutto alla sortilina e contribuisce alla neurodegenerazione, almeno in alcune aree del cervello. Da qui è nata una prospettiva. Mentre la possibilità di un intervento contro la sortilina, una proteina abbondante, distribuita in diversi compartimenti intracellulari, non sembrava fattibile, lo sviluppo di farmaci anti-precursori è al momento preso in seria considerazione. È troppo presto per fare previsioni. È certamente vero, però, che la farmacologia delle malattie neurodegenerative in generale, e dell'Alzheimer in particolare, ha grande bisogno di sviluppi, e questo potrebbe essere uno.

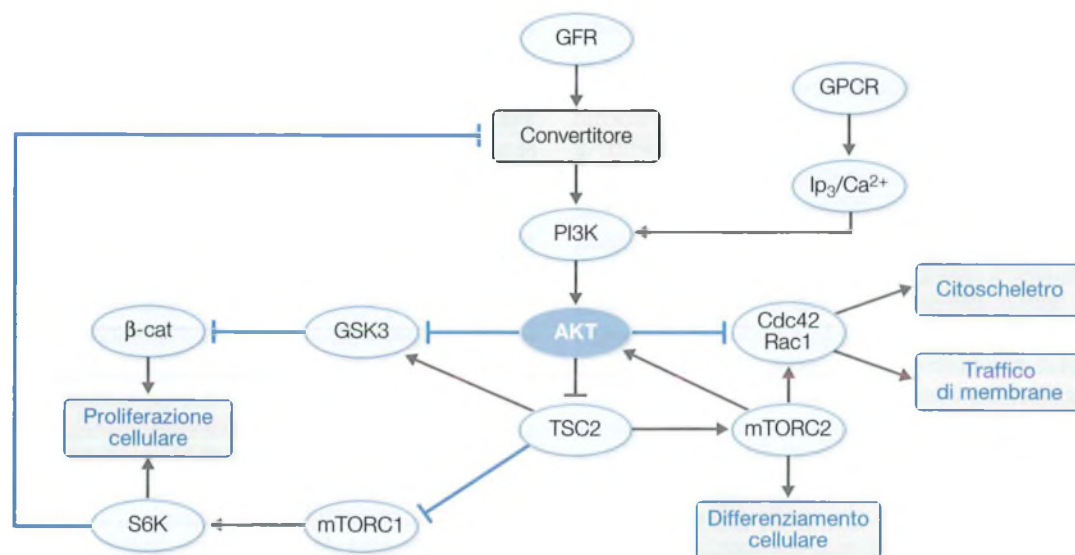


FIGURA 11.1 Quadro semplificato della segnalazione dei fattori di crescita attraverso la cascata della PI3 chinasi-AKT.

Passiamo alla rete di segnalazione. La reinterpretazione della cascata di segnali dei fattori di crescita, con il ruolo fondamentale di AKT e di mTOR, aveva già attratto grande interesse. In realtà TOR è un acronimo (*Target Of Rapamycin*) che dimostra il coinvolgimento precoce della Farmacologia in questi studi. La prospettiva era quella di usare la rapamicina, i suoi analoghi e altri farmaci di questo tipo come antitumorali. I risultati hanno ridimensionato notevolmente le aspettative. I farmaci di questo tipo, infatti, funzionano ma non sono risolutivi se non in pochi casi. Oggi l'interesse maggiore è per utilizzare l'esperienza fatta finora attraverso lo sviluppo di specifiche associazioni con effetto sinergico. Una di queste associazioni, quella tra rapamicina e bloccanti della PI3 chinasi, è al momento in avanzata fase di studio.

GSK3 è uno dei bersagli di massimo interesse. L'identificazione di farmaci specifici, capaci di modulare l'attività di una chinasi come questa, costitutiva e coinvolta in patologie importantissime, avrebbe certamente un grande successo. Tra l'altro, GSK3 è ora riconosciuta avere un ruolo chiave nel diabete di tipo 2. Al momento, però, nessuno è ancora riuscito a dissociare l'effetto della chinasi sulla secrezione di insulina da quello sulla proliferazione cellulare. Molti farmaci sono comunque già nelle diverse fasi di valutazione.

Infine, ancora sui tumori. Qui esiste un grande interesse per Wnt e per un altro sistema che condivide con Wnt interessanti aspetti di segnalazione, quello di Hedgehog (discusso brevemente nel CD: Approfondimento 11.2). Inizialmente i due sistemi sono stati studiati da embriologi molecolari (Hedgehog in drososofila), oggi si sa come i loro messaggeri nucleari governino l'espressione di oncogeni e partecipino allo sviluppo di tumori importantissimi. Anche qui è in corso un intenso lavoro, che al momento appare assai promettente, per sviluppare farmaci e riconoscere possibili associazioni virtuose.

La logica della segnalazione è quella del controllo attraverso feedback loops attivati nelle reti di segnalazione.

L'attivazione dei recettori per i fattori di crescita (GFR) induce l'attivazione di convertitori (IRS per il recettore dell'insulina, GRB2 e Shc per quello dell'EGF ecc.), e questo attiva la chinasi (PI3K) (attivata anche da recettori accoppiati a G-Proteine (GPCR) via IP₃/Ca²⁺) che provoca la formazione di fosfatidil inositolo-3,4,5 trisfosfato e la conseguente attivazione di AKT. Questa chinasi agisce come uno snodo inibitorio che agisce sulla GAP TSC2, la piccola GTPasi Rac1 e la GSK3, il bersaglio di Wnt (non compare nella figura). Ciascuna di queste vie inibite da AKT regola segnali o effetti di grande importanza. TSC2 inibisce mTORC1 e quindi la S6 chinasi, che controlla con altri enzimi la sintesi proteica e quindi la proliferazione cellulare. Inoltre TSC2 attiva mTORC2 che, oltre a promuovere il differenziamento cellulare (attraverso l'attivazione della trascrizione, non compare nella figura) a sua volta attiva AKT e le piccole GTPasi Rac1 e cdc42. Queste ultime controllano il fenotipo della cellula agendo sia sul citoscheletro che sul traffico di membrane intracellulari alla membrana plasmatica. Un altro bersaglio attivato da TSC2 è GSK3 che (tra l'altro) aumenta il turnover della β -catena (β -cat), un altro stimolatore della proliferazione, in questo caso attraverso la trascrizione di oncogeni come cMyc e la ciclina D1. Infine la S6 chinasi esercita una inibizione per feed-back a livello di convertitori dei recettori. Feedback loops compaiono almeno a 3 livelli: AKT/TSC2/mTORC2/Rac1; AKT/TSC2/GSK3; convertitore fino a S6 chinasi e indietro. Conseguenza di tutto questo è lo straordinario controllo della segnalazione. Ad esempio, sottolineiamo che l'attivazione di AKT da parte dei fattori di crescita provoca inibizione di TSC2 con conseguente attivazione di mTORC1 e inibizione di mTORC2 e GSK3 con conseguente stimolazione della proliferazione e l'inibizione del differenziamento, che invece prevale quando il tono dei fattori di crescita diminuisce. D'altro canto l'attivazione di mTORC1 segnala anche (tramite S6 chinasi) l'inibizione per feed-back del convertitore del recettore dei fattori di crescita che attenua il tono di questi ultimi.

TAKE HOME MESSAGE

- Gli effetti indotti dalla attivazione di specifici recettori possono essere diversi in cellule o in condizioni diverse a seconda del sistema traduttivo disponibile per la loro segnalazione.
- Nel caso di agonisti idrofobici la molteplicità dei recettori può includere anche recettori di superficie che agiscono attraverso secondi messaggeri e recettori intracellulari che agiscono attraverso la trascrizione di specifici geni, con induzione contemporanea di effetti rapidi e di effetti ritardati e persistenti.
- Soprattutto in chemioterapia della proliferazione cellulare, interventi molteplici indirizzati a livello di siti strategici di cascate di segnalazione importanti possono indurre interessanti effetti terapeutici sinergici.

Bibliografia essenziale

- ▶ Chen LW, Yung KK, Chan YS et al. The proNGF-p75NTR-sortilin signaling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008;7:512-23.
- ▶ Chen Y, Zeng J, Cen L et al. Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. *J Int Med Res* 2009;37:281-8.
- ▶ Dodge ME, Lum L. Drugging the cancer stem cell compartment: lessons learned from the Hedgehog and Wnt signal transduction pathways. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011;10:289-310.
- ▶ Greene LA, Angelastro JM. You can't go home again: transcriptionally driven alteration of cell signaling by NGF. *Neurochem Res* 2005;30:1347-52.
- ▶ Ha H, Han D, Choi Y. TRAF-mediated TNFR-family signaling. *Curr Protoc Immunol* 2009;11: Unit 11.9D.
- ▶ Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72: 609-42.
- ▶ Huang J, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 2009;37:217-22.
- ▶ Jin T, Fantus GI, Sun J. Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. *Cell Signal* 2008;20:1697-704.
- ▶ Levin ER. Extranuclear steroid receptors: roles in modulation of cell functions. *Mol Endocrinol* 2011;25:377-84. Epub 2010 Sep 22.
- ▶ Phukan S, Babu VS, Kannoji A et al. GSK3 β : role in the therapeutic landscape and development of modulators. *Brit J Pharmacol* 2010;160:1-19.
- ▶ Rao TP, Kuhl M. An updated overview on Wnt signaling pathways. *Circ Res* 2010;106: 1798-806.
- ▶ Ravni A, Vaudry D, Gardin MJ et al. cAMP-dependent, protein kinase A-independent signaling pathway mediating neuritogenesis through Egr1 in PC12 cells. *Mol Pharmacol* 2007;73:1688-708.
- ▶ Teng KK, Felice S, Kim T, Hempstead BL. Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges. *Dev Neurobiol* 2010;70:350-9.
- ▶ Zhang YE. Non-Smad pathways of TGF- β signalling. *Cell Res* 2010;19:128-39.

Le classi recettoriali

CAPITOLO 12

I recettori-canale

Cecilia Gotti, Francesco Clementi**CAPITOLO 13**

I recettori accoppiati alle proteine G

Lucia Vallar, Lucia Vicentini**CAPITOLO 14**

I recettori per i fattori di crescita

Silvia Giordano, Carla Boccaccio, Paolo M. Comoglio**CAPITOLO 15**

I recettori per le citochine

Massimo Locati**CAPITOLO 16**

I recettori che mediano l'adesione cellulare

Giorgio Berton, Carlo Laudanna**CAPITOLO 17**I recettori solubili e gli anticorpi monoclonali diretti
contro agonisti e recettori**Alberto Mantovani**

3

I recettori-canale

Cecilia Gotti, Francesco Clementi

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire conoscenze sulla struttura delle quattro diverse famiglie di canali ionici aperti da ligando
- ▶ Acquisire conoscenze sulla relazione struttura-funzione delle quattro principali famiglie di canali ionici
- ▶ Evidenziare la struttura molecolare e i meccanismi di attivazione attraverso i quali i ligandi attivano i recettori e le vie di segnalazione intracellulare
- ▶ Conoscere i meccanismi di attivazione ortosterica e allosterica di queste classi di recettori
- ▶ Acquisire le basi per comprendere il meccanismo d'azione di farmaci che agiscono su questa classe di recettori
- ▶ Discutere il razionale grazie al quale alcuni specifici recettori rappresentano bersagli farmacologici innovativi per lo sviluppo di nuove terapie per malattie umane

I recettori-canale sono canali ionici la cui apertura è modulata dall'interazione con specifici trasmettitori endogeni. A seguito del legame, il recettore cambia transitoriamente di conformazione aprendo un canale transmembranario intrinseco nella sua struttura. Gli ioni, spinti dal gradiente elettrochimico, passano attraverso il canale, determinano una variazione del potenziale elettrico di membrana e/o l'attivazione di vie di segnalazione intracellulare, dando così inizio alla risposta cellulare dovuta all'attivazione del recettore.

I recettori-canale sono tra i recettori più antichi comparsi nell'evoluzione, sono presenti in batteri e piante e hanno subito nel tempo meno trasformazioni riguardo alla struttura e alla funzione (vedi **CD**: Approfondimento 12.1. *Evoluzione dei recettori Cys-loop*).

A questa famiglia appartengono alcuni dei recettori per neurotrasmettitori classici ad ampia diffusione nel sistema nervoso centrale e periferico, come acetilcolina (ACh), GABA, glicina, glutammato e serotonina, i recettori attivati dai nucleotidi ciclici cGMP e cAMP e i recettori dell'ATP. I recettori-canale sono oligomeri formati da 3, 4 o 5 subunità e, sulla base della topologia delle subunità che li compongono, si possono suddividere in quattro classi:

1. recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori Cys-loop (recettori nicotinici muscolare e neuronale, recettore del GABA ($GABA_A$), della glicina e una sottoclasse di recettori della serotonina (5-HT₃);

2. recettori ionotropici del glutammato (recettori NMDA, AMPA e kainato);
3. recettori aperti da nucleotidi ciclici (recettori cAMP e cGMP);
4. recettori ionotropici dell'ATP (recettori P2X).

Sulla base della carica ionica che passa attraverso il canale aperto dall'interazione con il ligando (neurotrasmettitore o nucleotide), i recettori-canale possono indurre depolarizzazione o iperpolarizzazione (Tabella 12.1) e mediare rispettivamente eventi eccitatori o inibitori.

Distribuzione tessutale e subcellulare dei recettori-canale

Diversi recettori-canale sono localizzati a livello sinaptico

Quasi tutti i tipi cellulari esprimono recettori-canale, tuttavia essi sono presenti in maggior quantità e varietà nelle cellule nervose. Nei neuroni, i recettori-canale possono localizzarsi a livello presinaptico o postsinaptico, a livello del corpo cellulare o delle spine dendritiche, in regioni funzionalmente corrispondenti ai tratti apicali della membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare. Per una corretta funzionalità sinaptica sono indispensabili il reclutamento e il mantenimento dei recettori-canale

TABELLA 12.1 Recettori-canale e loro subunità clonate

Recettori		Sigla	Trasmittitore	Subunità clonate
Recettori permeabili a cationi	Recettore nicotinico muscolare	AChR	Acetilcolina	$\alpha_1, \beta_1, \gamma, \delta, \epsilon$
	Recettore nicotinico neuronale	nAChR	Acetilcolina	$\alpha_{2-10}, \beta_{2-4}$
	Recettori glutammatergici ionotropi	AMPA - KAR NMDAR	Amminoacidi eccitatori	GluA ₁₋₄ - GluK ₁₋₅ - GluN1 - GluN2 _{A-D} - GluN3 _{A,B}
	Recettore serotoninergico	5-HT ₃	Serotonina	5-HT _{3A-C}
	Recettore purinergico	P2X	ATP	P2X ₁₋₇
Recettori aperti dai nucleotidi ciclici	CNG	cAMP e cGMP	CNCA ₁₋₄ - CNCB _{1,3}	
Recettori permeabili ad anioni	Recettore GABAergico	GABA _A	GABA	$\alpha_{1-6} - \beta_{1-3} - \gamma_{1-3} - \delta, \epsilon, \pi, \theta - \rho_{1-3}$
	Recettore glicinergico	Gly-R	Glicina	$\alpha_{1-3} - \beta$

ai siti postsinaptici e questa specifica localizzazione è dovuta principalmente all'interazione dei recettori con un gruppo di proteine che formano un'impalcatura intracellulare che serve sia per l'ancoraggio dei recettori che per la loro corretta segnalazione intracellulare. La proteina rapsina, associata al recettore nicotinico muscolare, è indispensabile per la corretta aggregazione e localizzazione di questo alle sinapsi colinergiche neuro-muscolari. Questa interazione permette infatti un'espressione ad alta densità (10.000 molecole/ μm^2), all'apice delle pieghe della membrana postsinaptica, del recettore nicotinico muscolare e questa posizione strategica (il recettore è situato proprio di fronte ai siti di rilascio del neurotrasmettitore) è fondamentale per l'efficienza della trasmissione sinaptica. Alterazioni del posizionamento delle molecole recettoriali, come si hanno nella miastenia grave, partecipano a creare il difetto di trasmissione sinaptica tipico di questa malattia.

Nelle sinapsi inibitorie del cervello e del midollo spinale la presenza della proteina geferina è indispensabile per l'aggregazione, la localizzazione e la funzionalità dei recettori della glicina e di alcuni sottotipi di recettori GABA_A. Nella sinapsi glutammatergica, l'organizzazione della densità postsinaptica è più complessa e nella stessa sinapsi possono essere presenti sottotipi diversi di recettori del glutammato associati direttamente o indirettamente a un complesso di proteine di ancoraggio, impalcatura, segnalazione e del citoscheletro (vedi Capitoli 6 e 38). L'attività elettrica del neurone e/o l'attivazione di specifici sottotipi di recettore del glutammato regolano inoltre la traslocazione nella membrana postsinaptica di sottotipi diversi di recettore, modulando quindi la funzionalità della sinapsi. La precisa localizzazione e l'alta densità che si hanno in sede postsinaptica sono quindi dovute alla presenza di proteine specifiche associate ai recettori che sono in grado di interagire con il citoscheletro sottostante la membrana postsinaptica (Figura 12.1). È importante però notare che i recettori-canale possono essere presenti nella membrana plasmatica delle fibre muscolari scheletriche o del neurone anche in sedi extrasinaptiche e il ruolo svolto dai recettori in queste sedi è diverso da quello svolto a livello sinaptico. Nei neuroni, inoltre

molti recettori-canale sono espressi sulla membrana presinaptica, dove fungono da modulatori del rilascio di neurotrasmettitori svolgendo quindi una funzione importante nella regolazione dell'attività della sinapsi (Figura 12.1 e vedi Capitolo 32).

Organizzazione molecolare dei recettori-canale

■ I recettori-canale sono classificati in quattro classi

I recettori-canale sono proteine oligomeriche transmembranarie formati da 3, 4 o 5 subunità, con un singolo piano di simmetria rotazionale perpendicolare al piano della membrana dove sono inseriti. Sulla base della ipotetica o accertata topologia delle subunità che li costituiscono, questi recettori sono stati classificati in quattro classi.

Prima classe: famiglia dei recettori Cys-loop

Questa classe è caratterizzata dalla presenza, nella prima metà della regione amminoterminale (NH₂) extracellulare di ciascuna subunità, di un'ansa di 13 amminoacidi compresa tra due cisteine (corrispondenti alle Cys 128 e 142 della subunità α_1 del recettore nicotinico muscolare) che formano un ponte disolfuro importante per la struttura terziaria della subunità (Figura 12.2A)

A questa prima classe appartengono sia i recettori nicotinici muscolari (AChR) che neuronali (nAChR), i recettori del GABA (GABA_A), della glicina (Gly-R), e della serotonina (5-HT₃). Studi di immunolocalizzazione, mutagenesi ed espressione in ovociti, indicano che ciascuna delle subunità dei recettori appartenenti a questa classe è formata da un unico filamento di amminoacidi caratterizzato da un terminale amminico extracellulare, di circa 200 amminoacidi, al quale seguono quattro segmenti idrofobici (M1, M2, M3, M4) connessi tra loro da brevi anse. La proteina attraversa la membrana plasmatica quattro volte a livello dei quattro domini idrofobici. Tra i segmenti M3 ed M4 è presente un lungo tratto di sequenza intracellu-

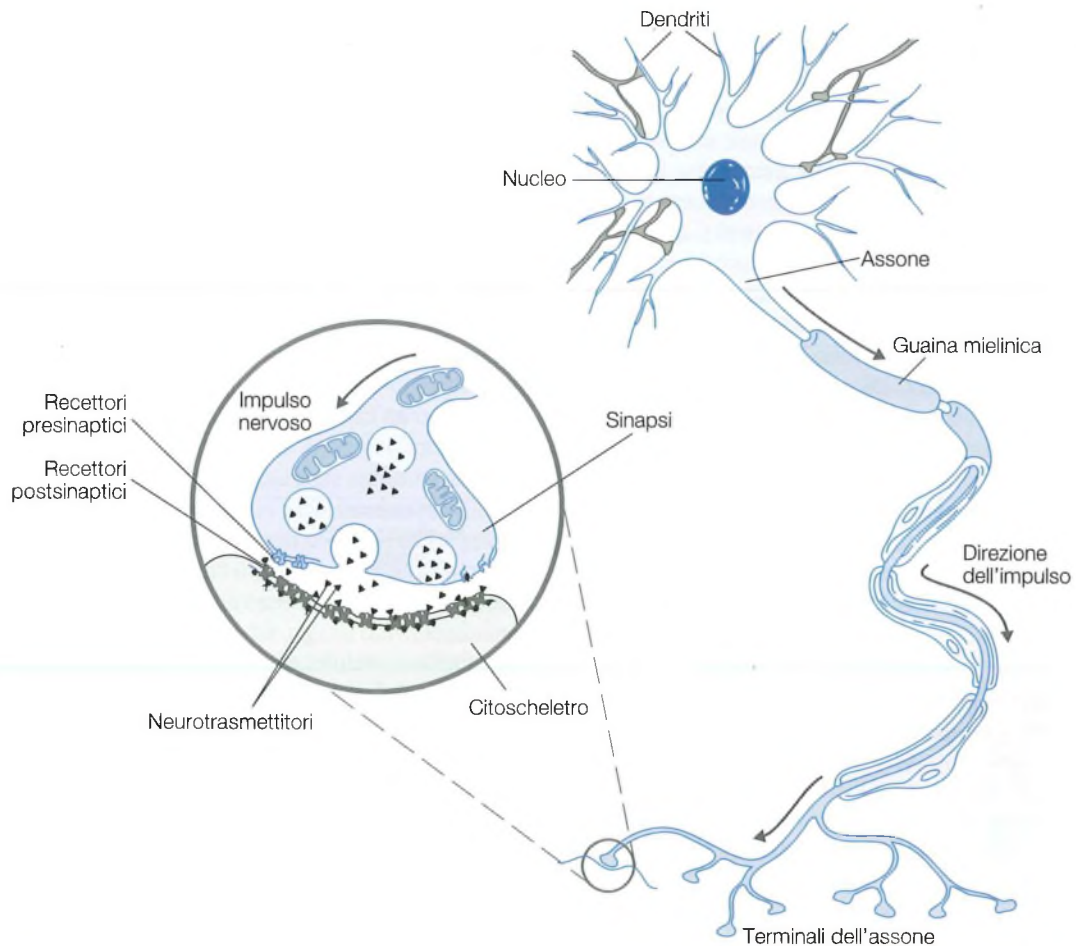


FIGURA 12.1 Rappresentazione schematica di un neurone, con il quale prendono contatto assoni provenienti da altre cellule nervose (in grigio). Nell'inserito, ingrandito, un contatto sinaptico.

Nella presinapsi sono presenti le vescicole di neurotrasmettitore che secernono il loro contenuto nella fessura sinaptica. I recettori sono presenti sia nella parte postsinaptica, dove regolano la risposta cellulare all'impulso nervoso, che nella parte presinaptica dove modulano la secrezione del neurotrasmettitore. Ad esempio in una giunzione colinergica, i recettori presinaptici possono riconoscere l'ACh secreta e in questo caso servono come meccanismo di autocontrollo della funzionalità della terminazione, e vengono definiti autorecettori; oppure possono riconoscere neurotrasmettitori secreti da terminazioni vicine. Nella giunzione colinergica vi possono anche essere recettori α -adrenergici che possono riconoscere le catecolamine secrete dalle terminazioni vicine e modulare quindi la secrezione della sinapsi colinergica; si ha così un controllo eterologo della funzionalità di una terminazione.

I recettori sono mantenuti nella posizione strategica nella membrana cellulare attraverso un'associazione diretta o indiretta a un complesso di proteine di ancoraggio, impalcatura, segnalazione e del citoscheletro.

lare e dopo il quarto segmento transmembrana (M4), vi è una breve coda extracellulare conclusa dal terminale carbossilico (Figura 12.2A). Le subunità di questa classe di recettori hanno un alto grado di omologia della sequenza amminoacidica (compresa tra il 20 e il 80%) e una distribuzione molto simile dei segmenti idrofobici che attraversano la membrana.

I recettori-canale di questa classe sono formati da 5 subunità proteiche (Figura 12.2B-C) e, sebbene ci siano possibilità che alcuni di questi recettori-canale possano essere formati da complessi di subunità identiche (omooligomeri), ad esempio il recettore nicotinico neuronale $\alpha 7$, nella grande maggioranza dei casi essi sono eteropentameri costituiti da due o più diversi tipi di subunità (eterooligomeri).

I recettori appartenenti a questa classe hanno quindi un'alta omologia sia strutturale che funzionale con una comune struttura dei domini importanti per definire la topologia delle subunità, il sito di legame degli agonisti e la struttura del canale ionico.

Seconda classe: recettori del glutammato

A questa classe appartengono i recettori ionotropici del glutammato che comprendono i recettori AMPA, kainato e NMDA, così chiamati dal nome degli agonisti che selettivamente legano questi recettori (vedi Capitolo 38). Le subunità dei recettori del glutammato sono costituite da un'unica catena polipeptidica con una larga regione



N-terminale extracellulare, quattro regioni transmembrana idrofobiche M1-M4 e una regione C-terminale intracellulare (Figura 12.2A). Solo le regioni M1, M3 e M4 attraversano la membrana, mentre la regione M2 entra nel piano della membrana, non lo attraversa, ma si ripiega e riesce dallo stesso lato della membrana formando una regione P analoga a quella presente nei canali ionici voltaggio-dipendenti (Figura 12.2A) (vedi Capitolo 22). I recettori del glutammato sono dei tetrameri e i recettori funzionali sono costituiti solo da subunità appartenenti alla stessa sottoclasse (AMPA o kainato o NMDA) che possono essere identiche (omooligomeri) o diverse (eterooligomeri) (Figura 12.2B).

Terza classe: recettori dei nucleotidi ciclici cGMP e cAMP

A questa classe appartengono i recettori permeabili ai cationi (Na^+ , K^+ , Ca^{++}) aperti dal cGMP presenti nei coni della retina, quelli aperti da cAMP, presenti nell'epitelio olfattivo e quelli aperti dai nucleotidi ciclici presenti in tessuti non sensoriali (ippocampo, cuore, rene, testicolo, intestino). In questi recettori, al contrario di quanto avviene per gli altri recettori-canale, il sito di legame del ligando è intracellulare. Dal punto di vista strutturale, questi recettori sono omologhi ai canali del potassio aperti dal voltaggio e sono costituiti da quattro subunità che delimitano un canale. Le subunità di questi recettori han-

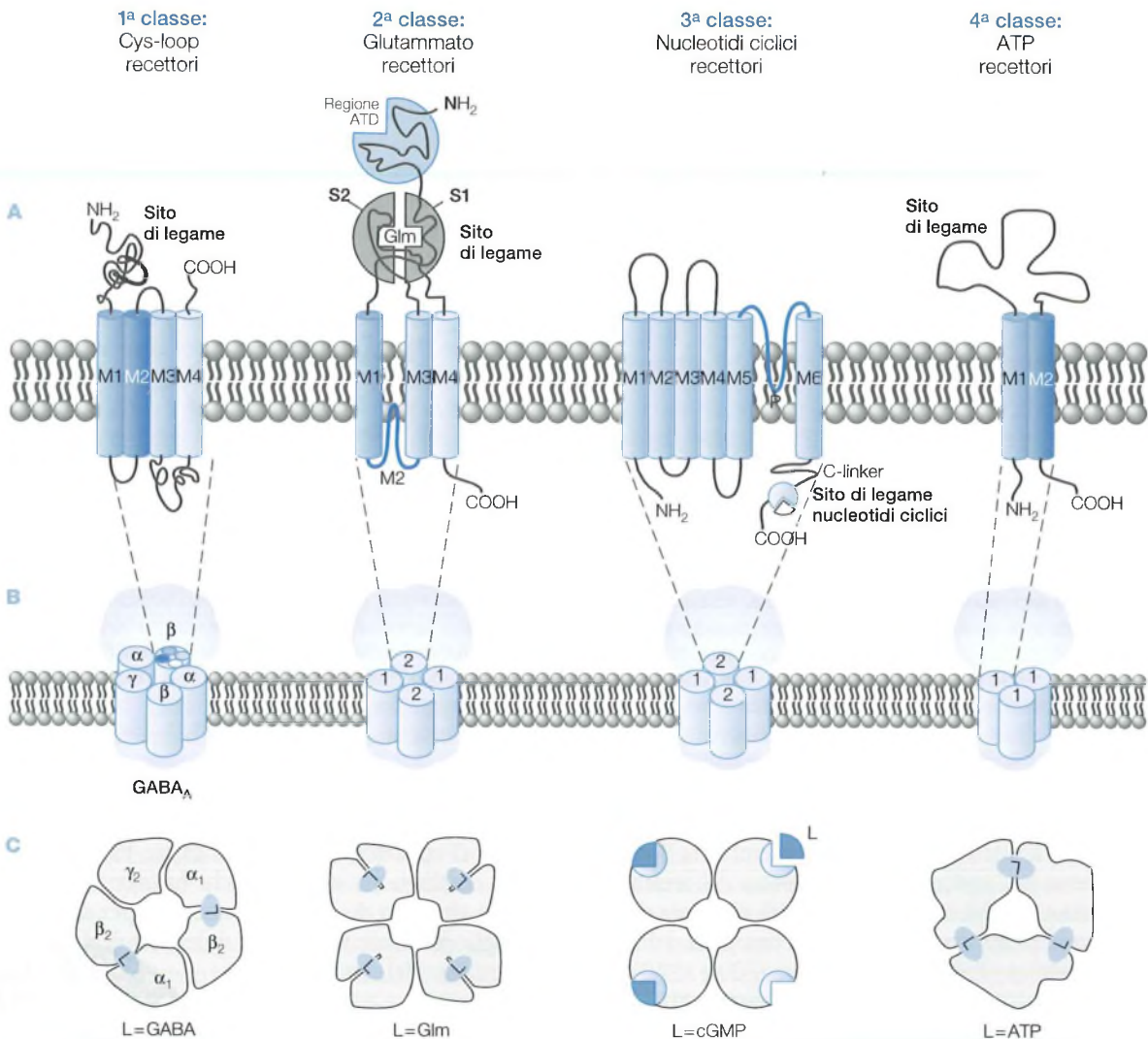


FIGURA 12.2 Composizione in subunità dei recettori-canale. In base al grado di omologia della sequenza amminoacidica delle subunità che li compongono, alla loro stechiometria e anche allo studio dei recettori cristallizzati, i recettori-canale possono essere schematicamente divisi in quattro classi qui rappresentate. La prima classe comprende i recettori Cys-loop a cui appartengono i recettori per l'ACh, per il GABA, per la glicina e per la serotonina; alla seconda classe appartengono i recettori per il glutammato; alla terza classe i recettori per nucleotidi ciclici; alla quarta classe i recettori per l'ATP. **A.** Topologia delle subunità dei recettori appartenenti alle quattro classi. NH₂ regione N-terminale; COOH, regione C-terminale. **B.** Schema dell'arrangiamento delle subunità a formare i recettori. **C.** Sezione trasversale dei recettori che mostra la stechiometria delle subunità che compongono le diverse classi di recettore. L: ligando fisiologico; Glm: glutammato.

no le regioni N- e C-terminale intracellulari, sei regioni transmembrana (M1-M6) e una regione localizzata tra M5 e M6 che forma una regione P, analoga a quella presente nei canali ionici voltaggio-dipendente e nei recettori del glutammato. La regione P, insieme al segmento transmembrana M6, delimita la parete del poro (Figura 12.2A).

I recettori presenti in vivo sono dei tetrameri eterooligomeriche composti dalle subunità CNGA e CNGB, con una stechiometria delle subunità variabile a seconda della localizzazione (Figura 12.2B-C).

Quarta classe: recettori ionotropici dell'ATP P2X

A questa classe appartengono i recettori ionotropici dell'ATP e finora sono state clonate sette subunità che codificano per recettori appartenenti a questa classe (P2X₁₋₇). Questi recettori sono degli oligomeri costituiti da tre subunità che hanno una topologia diversa da quella delle subunità finora viste. Ogni subunità è costituita dalle due regioni N- e C-terminale intracellulari, due regioni transmembrana M1 e M2 e una larga regione extracellulare costituita da circa 280 amminoacidi (Figura 12.2A-B e vedi Capitolo 39).

Topografia dei recettori

I recettori-canale sono complessi macromolecolari che attraversano la membrana cellulare

Del recettore nicotinico per l'ACh è stato possibile ottenere una dettagliata ricostruzione topografica che ha permesso di conoscere l'organizzazione molecolare di un recettore-canale.

Nella figura 12.3 è mostrata, in forma schematica, la struttura del recettore nicotinico muscolare con le 5 subunità glicoproteiche che si affiancano tra loro a cerchio in modo da formare il poro ionico in un ordine ben preciso (α_1 - γ - α_1 - δ - β_1) e che costituiscono nel loro insieme un complesso con peso molecolare di circa 300 kDa. I dati ottenuti da Unwin con la microscopia elettronica ad alta risoluzione mostrano che il recettore nicotinico ha la forma di un cilindro con un diametro di 8 nm e lungo 16 nm, costituito da una parte extracellulare a forma di imbuto, che sporge nello spazio extracellulare per circa 6,5 nm e con un diametro interno di 2 nm (Figure 12.3A-C e 12.4A). Sembra che l'imbuto abbia la funzione di concentrare gli ioni destinati a passare attraverso il canale. Nella porzione extracellulare del recettore sono anche localizzati i siti di legame per il neurotrasmettitore. In corrispondenza dell'attraversamento della membrana plasmatica, il recettore si restringe e si forma la regione critica per il funzionamento del recettore-canale. In questa regione amminoacidi carichi negativamente, presenti nelle 5 regioni transmembrana M2 (una per ogni subunità), formano tre anelli di cariche negative orientate verso l'interno del canale che delimitano principalmente il poro selettivo ai cationi (Figura 12.4).

La funzione di questi anelli di cariche è quella di sele-

zionare e concentrare i cationi e di respingere, per effetto della repulsione delle cariche, gli anioni. Questi anelli hanno quindi una carica negativa in quei recettori-canale che sono permeabili ai cationi (ad esempio, recettori nicotinici, Figura 12.4B), mentre sono non carichi in quelli permeabili ad anioni (ad esempio, Gly-R e GABA_A). In questa regione è anche localizzata la "porta" d'ingresso per i cationi che è normalmente chiusa ma che, dopo l'interazione del recettore con l'ACh, viene aperta e permette il passaggio dei cationi. Nella zona citoplasmatica, subito dopo il passaggio attraverso la membrana, il recettore si riallarga e gli ioni che entrano o escono dal lato citoplasmatico del recettore nicotinico passano attraverso strette aperture localizzate lateralmente in questa regione (Figura 12.4A). Nelle porzioni citoplasmatiche della macromolecola sono presenti inoltre i siti di fosforilazione, importanti per la regolazione della funzionalità del canale, e i siti di legame con le proteine del citoscheletro, importanti per la localizzazione precisa dei recettori nei domini specifici della membrana plasmatica.

Localizzazione dei siti di legame per i ligandi endogeni

Il sito di legame per i ligandi endogeni è localizzato nella porzione extracellulare dei recettori appartenenti alla superfamiglia dei recettori Cys-loop, dei recettori dell'ATP e del glutammato, mentre è localizzato intracellularmente per i recettori attivati dai nucleotidi ciclici (Figura 12.2A).

Recettori Cys-loop

Nella superfamiglia dei recettori Cys-loop dati più precisi si hanno per il recettore nicotinico sia per gli studi iniziali fatti utilizzando composti crossleganti, farmaci e tossine specifiche, sia per la recente determinazione della struttura a una risoluzione di 2,7 Å della *Acetylcholine Binding Protein* (AChBP). La AChBP è una proteina, secreta dalla lumaca marina *Limnea stagnalis*, che lega l'ACh. La AChBP è formata da cinque subunità uguali, che si assemblano a formare i siti di legame, omologhi strutturalmente a quelli presenti nel nAChR, ma manca della regione transmembrana che forma il canale nel recettore (Figura 12.5A).

L'allineamento delle sequenze amminoacidiche della AChBP e dei siti di legame dei neurotrasmettitori ha mostrato una buona omologia di sequenza (15-20%) con i recettori GABA, glicina e serotonina e la più alta con gli nAChR (25%). Quasi tutti i residui conservati tra i membri della famiglia Cys-loop sono presenti nella AChBP, inclusi quelli rilevanti per il legame dei ligandi e questo ha portato a ipotizzare e successivamente a dimostrare una comune struttura del sito di legame. Infatti, in questa classe di recettori, il sito di legame del neurotrasmettitore (ACh, GABA, glicina e serotonina) è all'interfaccia tra due subunità adiacenti in cui una subunità fornisce la componente principale del legame, costituita da corte sequenze non contigue che formano le anse (loop) A, B e C, e l'altra subunità partecipa con la componente complementare costituita dalle anse D, E ed F (Figura 12.5B).

Nel caso del recettore nicotinic muscolare l'ACh si lega alle interfacce α_1/γ e α_1/δ dove le subunità α contribuiscono con la componente principale, mentre le subunità γ o δ contribuiscono con la componente complementare. Nei recettori Cys-loop, quindi non tutte le subunità del recettore partecipano alla formazione dei siti di legame; nello stesso recettore i siti di legame possono essere non equivalenti e il numero dei siti di legame può variare. Ad esempio, per l'attivazione del recettore nicotinic muscolare è necessario il legame di entrambi i due siti da parte dell'ACh, mentre nel caso dei recettori omomerici, come alcuni recettori GABA_A e della glicina (GlyR), che hanno cinque siti di legame, è necessario il legame del neurotrasmettitore a tutti e cinque i siti per ottenere la piena attivazione dei recettori. La complessità del sito di legame del neurotrasmettitore non stupisce, poiché il sito di legame non solo deve riconoscere in modo selettivo il neurotrasmettitore, ma

anche dare inizio a quelle modifiche conformazionali che portano all'apertura del poro distante circa 5 nm. Per fare ciò è quindi necessario che tratti della molecola, anche assai distanti tra loro in termini di sequenza primaria, abbiano la possibilità di interagire.

Non è ancora completamente definito come, in seguito al legame dell'ACh, avvenga esattamente la modifica della conformazione del recettore nicotinic muscolare, ma è utile ricordare che il sito di legame, situato nella porzione extracellulare della subunità α , è in stretta connessione con le subunità adiacenti. Si ritiene che il legame della testa cationica dell'ammonio quaternario dell'ACh a un sottosito costituito da amminoacidi aromatici presenti nelle anse A, B, C e D e la contemporanea attrazione da parte dell'ammonio quaternario dei residui carichi negativamente presenti probabilmente negli amminoacidi D180 o E189 della subunità δ e l'omologo D 174 della subunità γ , avvicini questi due siti creando così un movimento

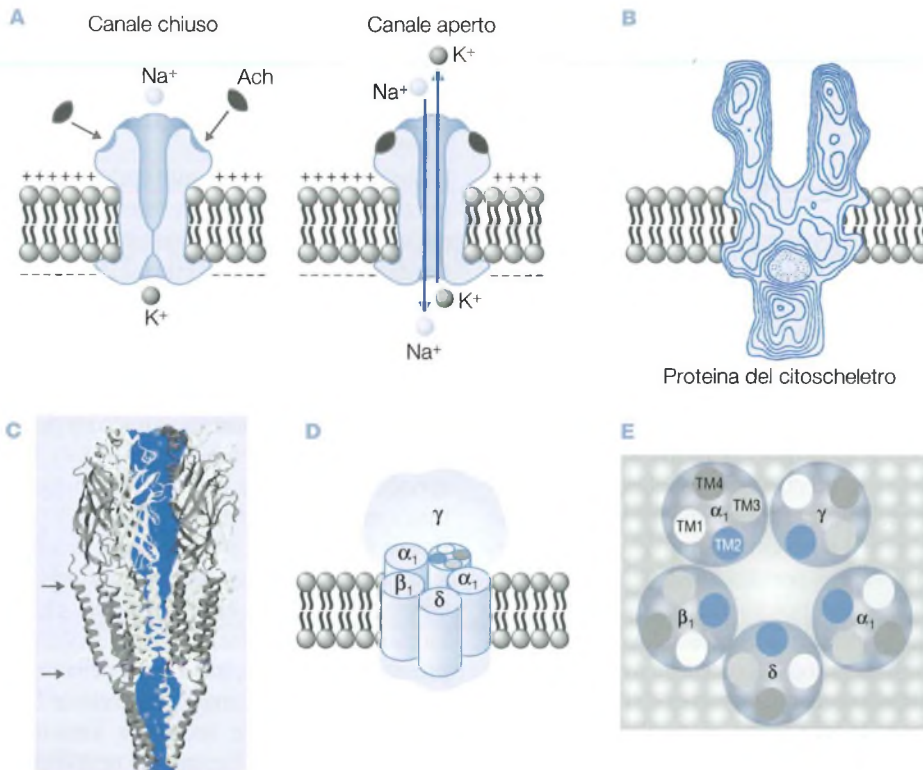


FIGURA 12.3 Schema dell'apertura del recettore nicotinic dell'ACh muscolare e della sua struttura molecolare. **A.** In seguito al legame di due molecole di ACh alle due subunità α_1 , si ha una modificazione conformazionale del recettore con conseguente apertura del canale transmembranario intrinseco al recettore (vedi anche figura 12.4 C e D). **B.** Immagine ricostruita al microscopio elettronico del recettore nicotinic di torpedine presente nella membrana. L'immagine è stata ottenuta mediante elaborazione da parte del computer delle immagini del recettore colorato con la tecnica del negative staining, con una risoluzione di 5 Å. Si può osservare la lunga cavità extracellulare che forma l'imbuto nel quale vengono raccolti gli ioni che devono essere traslocati, il restringimento del lume a livello della membrana plasmatica dove avvengono la selezione e il passaggio degli ioni e le proteine del citoscheletro che legano il recettore nella zona citoplasmatica. **C.** Struttura tridimensionale del recettore nicotinic di torpedine ricavato da analisi cristallografiche a raggi X. Le subunità α_1 sono presentate in bianco e le non- α -subunità in grigio. La superficie esterna del canale è indicata in blu. Le frecce indicano i limiti della membrana cellulare. Confrontando B e C è interessante notare come due tecniche molto diverse, la microscopia elettronica e la diffrazione a raggi X, permettano di ricostruire strutture di forma e dimensioni molto simili. **D.** Struttura pentamerica del recettore nicotinic muscolare. Le cinque subunità si affiancano tra loro in cerchio in modo da formare il canale ionico in un ordine ben preciso α_1 - γ - α_1 - δ - β_1 . Ogni subunità è composta da una lunga porzione NH₂-terminale extracellulare e da quattro segmenti idrofobici (M1, M2, M3, M4). **E.** Sezione trasversale, vista dall'alto, delle cinque subunità associate a formare il canale. Sono indicate nelle singole subunità le posizioni relative delle regioni transmembrana (M1-M4) e le posizioni delle regioni M2 che delimitano le pareti del canale.

di slittamento tra le subunità che porta all'apertura del canale (Figura 12.4C-D).

Nella giunzione neuromuscolare di rana, l'interazione dell'ACh con una molecola di AChR produce un influsso di cariche positive (per lo più sodio) con una velocità di 10.000 atomi/ms. Il canale si apre circa 10 ms dopo che l'ACh si è legata, rimane allo stato aperto per 1-4 ms con una conduttanza di 50 picosimens (pS). L'apertura di un singolo canale produce una depolarizzazione della membrana postsinaptica di 0,5 μ V. La durata dell'aper-

tura del canale dipende dall'agonista: il carbacolo apre il canale per circa un terzo del tempo della ACh mentre la suberidilcolina provoca una persistenza assai più lunga del recettore nello stato aperto.

L'alta omologia strutturale, sia nel sito di legame del neurotrasmettitore che nella struttura del canale, dei recettori appartenenti alla famiglia dei recettori Cys-loop suggerisce che il sistema di accoppiamento tra il legame del neurotrasmettitore e l'apertura del canale sia simile per tutti i recettori appartenenti a questa classe.

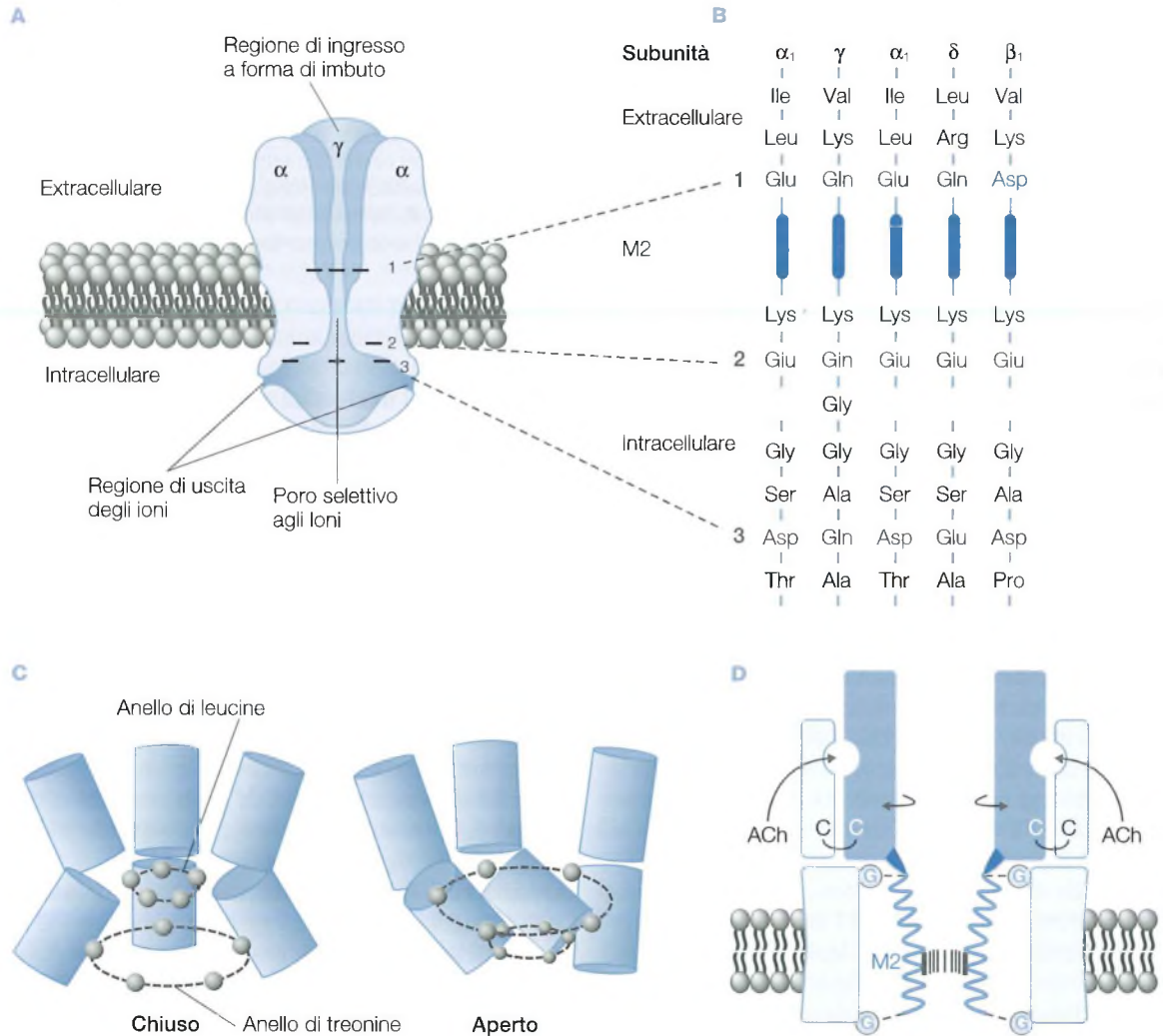


FIGURA 12.4 Modello del canale del recettore dell'ACh muscolare e del suo funzionamento. Il modello qui rappresentato è stato ricavato dagli esperimenti di Numa, Unwin e collaboratori. **A.** Sezione verticale del recettore muscolare dell'ACh con evidenziati gli anelli di cariche negative che determinano la selettività ai cationi, il poro selettivo agli ioni e le regioni di entrata e uscita degli ioni nel lato citoplasmatico del recettore. Secondo questo modello gli amminoacidi carichi negativamente presenti ai bordi dei segmenti M2 di ogni subunità formano tre anelli di cariche negative attorno al poro. **B.** Sono mostrati i segmenti M2 e le regioni adiacenti di ognuna delle cinque subunità che formano il recettore e delimitano il canale. Sono anche rappresentati gli amminoacidi che formano gli anelli 1, 2 e 3 mostrati in A. **C.** Modello dell'arrangiamento di tre regioni transmembrana M2 delle subunità dell'AChR nello stato chiuso (sinistra) o aperto (destra); la quarta e la quinta regione non sono mostrate per chiarezza dello schema. Quando il canale è chiuso, gli emicilindri della regione M2 delle cinque subunità proiettano verso l'asse centrale del canale e cinque amminoacidi idrofobici (leucina), uno per ogni subunità, formano un anello che occlude il poro del canale. Quando l'ACh si lega al recettore, gli emicilindri M2 ruotano all'interno del canale in modo tale che l'anello di leucine si allarghi e permetta il passaggio degli ioni. Contemporaneamente l'anello di treonine si restringe e si crea quindi il filtro selettivo per gli ioni. **D.** Schema del funzionamento del recettore nicotinic. Il legame dell'ACh al recettore induce una rotazione nella subunità α che tramite le regioni M2 è trasmessa al poro selettivo del canale. La rotazione destabilizza il filtro selettivo e fa sì che le α eliche M2 adottino una nuova conformazione permeabile agli ioni.

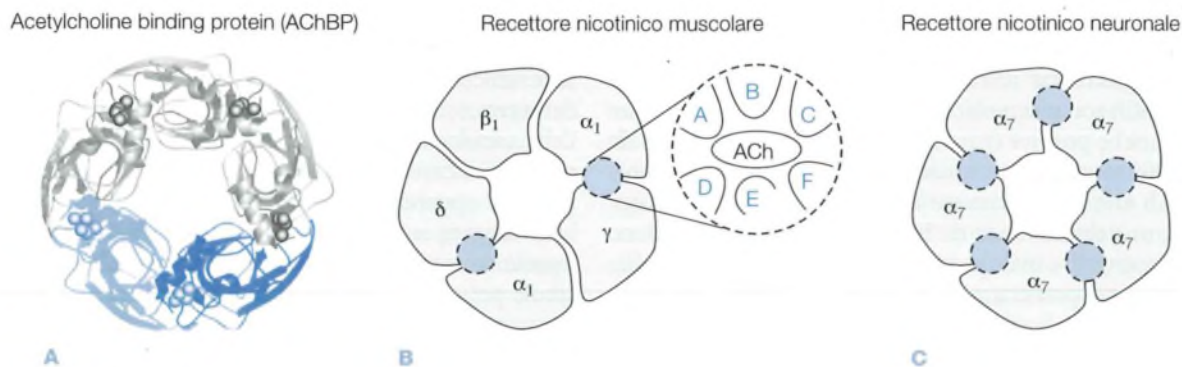


FIGURA 12.5 Schema dell'organizzazione delle subunità e formazione dei siti di legame dell'ACh nella proteina che lega l'ACh (AChBP) e in due sottotipi diversi di recettori nicotinici. **A.** Modello tridimensionale a nastro della proteina AChBP, con visualizzazione delle strutture secondarie ad α elica e a foglietto β , ottenuto mediante studi di cristallografia. Le cinque subunità identiche si associano a formare la proteina con i siti di legame per l'ACh (pallini). **B.** Schema dell'arrangiamento delle subunità nel delimitare i siti di legame dell'ACh e le regioni identificate che partecipano alla formazione del sito di legame del neurotrasmettitore al recettore nicotinic muscolare (parte ingrandita). Nel recettore muscolare sono presenti 2 siti di legame dell'ACh che sono all'interfaccia tra la subunità α (sito principale, anse A, B, C) e le subunità γ o δ (sito complementare, anse D, E, F). **C.** Schema dell'arrangiamento delle subunità nel delimitare i cinque siti di legame dell'ACh nel recettore nicotinic omomero α_7 . Nel caso del recettore omomero il sito di legame è così costituito: le anse A, B, e C di una subunità α_7 , formano il sito principale di legame, mentre le anse D, F ed E della subunità α_7 adiacente, formano il sito complementare di legame.

Questo è stato elegantemente dimostrato utilizzando un recettore chimerico costituito dalla regione N-terminale extracellulare della subunità α_7 del recettore nicotinic neuronale e dalla regione transmembrana e C-terminale della subunità del recettore 5-HT₃. Questo recettore chimerico è attivato dall'ACh e da ligandi nicotinici ma ha le caratteristiche del canale tipiche del recettore 5-HT₃.

Recettori per il glutammato

Il sito di legame per gli amminoacidi eccitatori nei recettori glutammatergici è diverso da quello descritto precedentemente. Studi cristallografici del recettore GluA2 hanno evidenziato che ogni subunità è caratterizzata da una regione N-terminale extracellulare, regione N-terminale ATD costituita da circa 400 amminoacidi (Figura 12.2A) e dalla regione di legame del glutammato, costituita da due regioni non contigue denominate S1, localizzata tra la regione ATD e l'inizio della prima regione transmembrana M1, ed S2 localizzata tra le regioni transmembrana M3 e M4 (vedi Capitolo 38). Nella singola molecola di recettore, costituita da quattro subunità, sia la regione ATD che la regione di legame del glutammato sono organizzate come dimeri di dimeri.

Studi di cristallografia, di binding, di espressione in oociti di recettori chimerici, ottenuti sostituendo le regioni S1 e S2 dei recettori AMPA e kainato, e di formazione di proteine di fusione contenenti solo le due regioni S1 e S2, hanno permesso di identificare queste due regioni come quelle indispensabili per legare il glutammato e per determinare la specificità farmacologica dei diversi sottotipi di recettore. Inoltre, nel caso dei recettori non-NMDA, questi studi hanno dimostrato che per l'apertura del canale occorre il legame indipendente di quattro molecole di glutammato (una per ciascuna subunità del recettore) (Figura 12.2C).

Recettori per i nucleotidi ciclici e ATP

I recettori attivati dai nucleotidi ciclici hanno il sito di legame per i loro ligandi localizzato nella regione intracellulare C-terminale delle subunità in una sequenza omologa alle regioni che legano i nucleotidi ciclici in altre proteine, quali le proteinchinasi cAMP e cGMP-dipendenti e i fattori di trascrizione (Figura 12.2A). Il sito di legame è collegato alla regione transmembrana M6 attraverso una regione di 80 amminoacidi (C-linker) che favorisce, dopo il legame dei nucleotidi ciclici, l'apertura del canale. Questa regione linker contribuisce anche alla formazione dei contatti tra le subunità del canale e ne favorisce la tetramerizzazione. L'attivazione di questi recettori, che sono dei tetrameri costituiti da quattro subunità uguali o diverse, si ottiene dal legame di due-quattro molecole di ligando per ogni recettore (Figura 12.2C).

I recettori dell'ATP sono costituiti da tre subunità e la loro attivazione necessita del legame di tre molecole di ATP. Studi volti all'identificazione del sito di legame dell'ATP hanno dimostrato che amminoacidi localizzati in punti diversi dell'estesa regione extracellulare e conservati tra i diversi sottotipi di recettori P2X formano una tasca, tra due subunità adiacenti, costituita da otto amminoacidi, quattro per ciascuna subunità a cui si lega l'ATP (Figura 12.2). Studi di mutagenesi ed espressione eterologa hanno anche identificato gli amminoacidi presenti nella regione extracellulare, che determinano la sensibilità dei sottotipi recettoriali ai diversi antagonisti individuando, in alcuni casi, anche gli amminoacidi importanti per la risposta specie-specifica agli antagonisti.

La conoscenza della struttura molecolare del sito di legame dei trasmettitori e della sua conformazione spaziale è di grande importanza per il disegno di nuovi farmaci attivi a questo livello, anche se l'attuale strategia di ricerca di farmaci agonisti o antagonisti si basa invece sulla

conoscenza molecolare dell'agonista o degli antagonisti noti, che vengono modificati per approssimazioni successive fino a trovare la molecola dotata di maggiore utilità.

Localizzazione e struttura del canale per gli ioni

Superfamiglia dei recettori Cys-loop

I dati più accertati riguardano la struttura del recettore nicotinic muscolare e sono stati ottenuti con la microscopia elettronica, con la mutagenesi sito-specifica utilizzando il metodo di accessibilità delle cisteine sostituite o SCAM (vedi **CD**: Approfondimento 12.2. *Come identificare i residui amminoacidici che si affacciano al lume del canale*) e recentemente con la cristallizzazione di recettori.

Questi studi indicano che il canale ionico di questa classe di recettori è un cilindro quasi simmetrico formato dai segmenti M2 di ciascuna subunità; attorno a questi 5 segmenti stanno gli altri segmenti, M1, M3, M4, di ciascuna subunità, che sono necessari per l'interazione con i fosfolipidi della membrana e per l'organizzazione strutturale di questa parte complessa del recettore (Figura 12.2B). I segmenti M2 sono α -eliche anfipatiche che presentano, in appaiamento verticale rispetto al piano della membrana, una striscia di amminoacidi non carichi e idrofobici. L'accostamento delle strisce delle 5 subunità porta alla formazione della parete interna del canale, che permette il passaggio degli ioni (Figura 12.3D-E).

Come già descritto in precedenza, i tratti M2 presentano degli amminoacidi carichi disposti in modo tale che, quando le 5 subunità sono affiancate tra loro a formare il recettore-canale, essi si allineano così da costituire tre anelli carichi, posti a livelli diversi lungo il canale (Figura 12.4A-B). Il primo e il terzo degli anelli influenzano la conduttanza dei cationi, anche se altri amminoacidi presenti nella regione M2 possono influenzare tale conduttanza. Il secondo anello, nel caso dell'AChR e del recettore 5-HT₃ (permeabili ai cationi), è costituito da amminoacidi carichi negativamente, mentre, nel caso del recettore GABA_A e Gly-R (permeabili agli anioni), questi sono amminoacidi non carichi. Mutazioni degli amminoacidi di questo anello nell'AChR determinano una profonda alterazione della conduttanza dell'AChR muscolare, indicando quindi che questo anello è molto importante per determinare la selettività ionica.

Studi al microscopio elettronico hanno dimostrato che nel recettore allo stato chiuso la regione M2 non è dritta ma è costituita da due emicilindri uno superiore e uno inferiore. Quando il canale è chiuso gli emicilindri della regione M2 delle cinque subunità proiettano verso l'asse centrale del canale e cinque amminoacidi idrofobici (leucina), uno per ogni subunità, formano un anello che occlude il poro del canale. Quando l'ACh si lega al recettore, gli emicilindri M2 ruotano all'interno del canale e l'anello di leucine si allarga. Un anello di amminoacidi idrofilici (treonine) posto sotto l'anello di leucine forma inoltre il poro selettivo (Figura 12.4C).

In seguito al legame dell'ACh al recettore si induce una rotazione nella subunità α che, tramite le regioni M2, è trasmessa al poro selettivo del canale. La rotazione destabilizza il filtro selettivo e fa sì che le α eliche M2 adottino una nuova conformazione permeabile agli ioni (Figura 12.4C-D).

I recettori-canale non posseggono un'elevata capacità di selezione tra le varie specie ioniche aventi la stessa carica: attraverso il canale del nAChR possono infatti fluire, gradiente elettrochimico permettendo, sia ioni monovalenti come Na⁺ e K⁺, che ioni bivalenti come Ca²⁺.

La selettività, anche se parziale, può differire tra sottotipi di uno stesso recettore: ad esempio, la permeabilità allo ione Ca²⁺ è bassa nel sottotipo muscolare di AChR e alta in alcuni sottotipi neuronali (in particolare, quelli contenenti la subunità $\alpha 7$). Un ruolo importante nel definire la selettività nei confronti di una determinata specie ionica è la composizione amminoacidica del territorio M2 delle subunità che formano il complesso recettore-canale. Ciò è ben esemplificato da esperimenti compiuti sul recettore nicotinic neuronale $\alpha 7$, dove la neutralizzazione dell'acido glutammico presente nell'anello intermedio con l'alania determina una completa perdita di permeabilità al Ca²⁺ senza modificazione della permeabilità a Na⁺ e K⁺.

Recettori del glutammato, nucleotidi ciclici e ATP

Sebbene la topologia delle subunità dei recettori del glutammato sia diversa da quella dei recettori nicotinic, i canali attraverso cui passano gli ioni sono funzionalmente simili: anche questo canale ha un vestibolo extracellulare a forma di imbuto, che si restringe fino alla regione del poro selettivo che è di dimensioni pari a quello presente nel recettore nicotinic. Le pareti del poro sono delimitate dalla regione P rientrante, che corrisponde funzionalmente alla regione M2. A livello di questa regione P, le subunità dei recettori del glutammato che compongono alcuni dei recettori non-NMDA (vedi Capitolo 38) hanno in un preciso punto della sequenza un amminoacido che può essere glutammina (Q) o arginina (R): i sottotipi recettoriali composti da subunità contenenti Q sono dotati di permeabilità elevata sia al Na⁺ che al Ca²⁺ mentre quelli con subunità contenenti R sono poco permeabili agli ioni Ca²⁺. Le subunità che invece formano i recettori per gli amminoacidi eccitatori del sottotipo sensibile all'NMDA contengono, nella stessa posizione, un residuo di asparagina (N) che conferisce loro sia l'alta permeabilità al Ca²⁺ che la sensibilità al blocco da magnesio che sono caratteristiche di questo recettore (per informazioni più dettagliate, vedi Capitolo 38).

Nei recettori per i nucleotidi ciclici è stata identificata la regione del poro del canale utilizzando il metodo delle cisteine sostituite o SCAM (vedi **CD**: Approfondimento 12.2). Questa regione, detta regione P, è compresa tra le regioni transmembrana M5 e M6, forma un'ansa con una struttura ad α elica che dall'esterno si estende verso

l'asse centrale del canale e poi ripiega in una struttura srotolata verso l'esterno. Questa regione P è altamente omologa alla stessa regione presente nei canali al K^+ e, oltre a formare il filtro selettivo ai cationi, funziona anche da "porta" la cui struttura cambia quando si apre il canale (Figura 12.2A).

Sempre utilizzando il metodo SCAM, è stato possibile identificare che nei recettori dell'ATP la parete del canale è delimitata dalle tre regioni M2, una per ciascuna subunità, circondate dalle tre regioni M1 (Figura 12.2A). Inoltre recentemente un primo studio ai raggi X del recettore $P2X_4$ cristallizzato ha mostrato che le tre subunità che nel cristallo mostrano ognuna una forma a delfino (Figura 12.6A) si avvolgono l'una sull'altra per formare il recettore trimerico (Figura 12.6B).

Lo studio dei cristalli del recettore $P2X_4$ ha mostrato che nello stato chiuso i segmenti M2 sono inclinati rispetto al piano della membrana, dando al canale un aspetto di clessidra composto da tre diversi vestiboli (superiore, centrale ed extracellulare) nella parte extracellulare e da un vestibolo intracellulare (Figura 12.6C). Nei vestiboli extracellulare e centrale sono presenti in alta concentrazione amminoacidi acidi che hanno la funzione di concentrare i cationi vicino al poro. La regione del poro è localizzata tra il vestibolo extracellulare e quello intracellulare, nello stato chiuso il poro è inaccessibile agli ioni provenienti dall'esterno, ma, in seguito al legame dell'ATP al recettore, si ha un riarrangiamento delle tre a eliche M2 con apertura del poro.

Studi di mutagenesi compiuti sul recettore $P2X_2$ hanno dimostrato che i residui amminoacidici che occludono la via di permeazione del poro nello stato chiuso sono gli stessi che contribuiscono alla formazione del filtro selettivo ai cationi nel canale aperto.

Funzioni della porzione citoplasmatica

La zona citoplasmatica controlla la funzionalità, la localizzazione e il traffico dei recettori

Nell'AChR muscolare questa zona è costituita essenzialmente dalle lunghe anse che uniscono i territori M3 ed M4. In esse sono localizzati i siti di fosforilazione che controllano la velocità con cui progredisce il fenomeno della desensitizzazione e lo stato di aggregazione nella membrana postsinaptica. In questi tratti vi sono sequenze amminoacidiche che rappresentano il substrato di varie chinasi: nel recettore nicotinico la proteinchinasi A (PKA) fosforila le subunità δ ed ϵ , la proteinchinasi C (PKC) le subunità α e δ , e una tirosinochinasi le subunità β e δ . La fosforilazione in questi siti può comportare modificazioni importanti delle proprietà del recettore: la fosforilazione da PKA produce un aumento delle aperture spontanee del recettore, la fosforilazione da parte di PKC aumenta la velocità con la quale il recettore si desensitizza (vedi oltre) e la fosforilazione da tirosinochinasi è importante per la concentrazione ad alta densità dell'AChR nella membrana postsinaptica.

Studi compiuti su recettori espressi in sistemi eterologhi (cellule trasfettate, oociti) hanno inoltre dimostrato che, nel caso del recettore $GABA_A$, la fosforilazione delle subunità ha effetti diversi sulla funzionalità del recettore a secondo del sottotipo. La PKA modula infatti negativamente l'attività dei recettori contenenti la subunità β_1 mentre, al contrario, modula positivamente l'attività dei recettori contenenti la subunità β_3 .

È interessante osservare che le chinasi sono attivate da secondi messaggeri sintetizzati in seguito alla stimolazione di altri recettori (vedi Capitoli 6 e 10); è questo un esempio

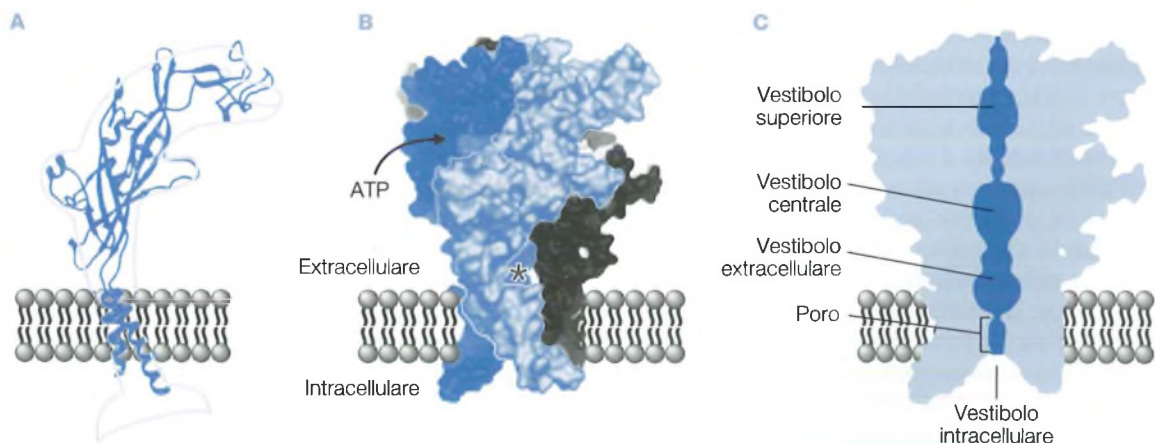


FIGURA 12.6 Struttura del recettore trimerico $P2X_2$ cristallizzato, definita ai raggi X. **A.** Rappresentazione di una singola subunità del recettore $P2X_2$ all'interno del recettore trimerico. Per la sua forma essa è stata definita "forma a delfino" (vedi outline in grigio). **B.** Rappresentazione a spazio pieno della superficie del recettore $P2X_4$ con le tre subunità identiche disegnate con colore di diversa intensità, e il sito di legame dell'ATP all'interfaccia tra due subunità adiacenti. L'asterisco indica una delle tre fenestrate tra subunità presenti nel recettore. A questo livello si apre verso l'esterno il vestibolo extracellulare fornendo un punto di passaggio in entrata o in uscita degli ioni dal lato extracellulare del canale. **C.** Disegno schematico del canale ionico del recettore $P2X_2$ che mostra i tre vestiboli e il poro selettivo agli ioni. Se si confronta questo schema con quelli della figura 12.3 B e C, si nota come si giunga a una struttura tridimensionale simile dei due tipi di recettore partendo da una composizione molecolare molto diversa.

di come recettori diversi con diversi sistemi di trasduzione del segnale possono influenzarsi reciprocamente. La regione intracellulare delle subunità nicotiniche è anche importante per la localizzazione dei diversi sottotipi di recettori nicotinici. A livello del ganglio ciliare di pollo esistono due diversi sottotipi di recettori, uno contenente la subunità $\alpha 3$ a localizzazione sinaptica e un sottotipo contenente la subunità $\alpha 7$ a localizzazione perisinaptica ed escluso dalla sinapsi. Scambiando solo l'ansa citoplasmatica localizzata tra le regioni M3 e M4 della subunità $\alpha 7$ con quella della regione omologa presente nella subunità $\alpha 3$, si ottiene un recettore chimerico $\alpha 7$ che ha una localizzazione uguale a quella del recettore contenente la subunità $\alpha 3$, indicando quindi che l'ansa citoplasmatica di $\alpha 3$ è sufficiente per determinare la localizzazione sinaptica del recettore che la contiene.

Nel caso del recettore GABA_A la regione intracellulare della subunità γ lega selettivamente una proteina di 17 kDa (GABARAP) che è coinvolta nel trasporto intracellulare del recettore GABA_A, nella sua localizzazione e nel suo accumulo a livello delle sinapsi inibitorie del SNC (vedi Capitolo 6).

Modulazione dell'attività dei recettori-canale

L'entità della risposta cellulare indotta dai recettori-canale a seguito dell'interazione con l'agonista è modulabile da almeno due variabili: la differenza di potenziale transmembrario e la durata della stimolazione recettoriale.

La direzione e l'entità delle correnti che passano attraverso i recettori-canale dipendono dal potenziale di membrana

In genere il flusso di ioni attraverso i recettori-canale varia proporzionalmente con il potenziale di membrana: la relazione corrente/voltaggio è cioè lineare. Fanno eccezione i recettori per gli amminoacidi eccitatori del sottotipo sensibile all'NMDA: in questi l'apertura del canale richiede non solo l'occupazione dei siti di interazione con i neurotrasmettitori, ma anche una parziale depolarizzazione della membrana cellulare (vedi Capitolo 38).

È importante ricordare che i recettori-canale sono caratterizzati da scarsa capacità di selezione della specie ionica permeante. Di conseguenza, attraverso il canale dell'AChR può entrare nella cellula il Na⁺ (e anche il Ca²⁺), ma anche uscire il K⁺. A potenziali inferiori a quello di inversione dell'AChR (circa 0 mV) prevale l'influsso di Na⁺ a potenziali maggiori prevale l'efflusso di K⁺. Quindi la stimolazione di un recettore-canale permeabile a cationi è virtualmente priva di effetti se la cellula è già depolarizzata e ha un potenziale di membrana pari al potenziale di inversione del recettore (Figura 12.7). Nel caso di recettori-canale per anioni, l'influsso di cloro (Cl⁻) unica specie ionica negativa permeante, si ha finché il potenziale è superiore a quello di equilibrio per lo

ione (circa -70 mV); a potenziali inferiori (tra -80 e -100 mV) lo ione effluisce dalla cellula e riporta il potenziale di membrana al potenziale di equilibrio degli ioni Cl⁻ (Figura 12.7). In qualunque caso l'attivazione di questi recettori si traduce in inibizione dell'attività sinaptica perché il potenziale di membrana viene mantenuto a un valore ben distante da quello soglia (-55 mV).

L'attivazione continua provoca desensitizzazione

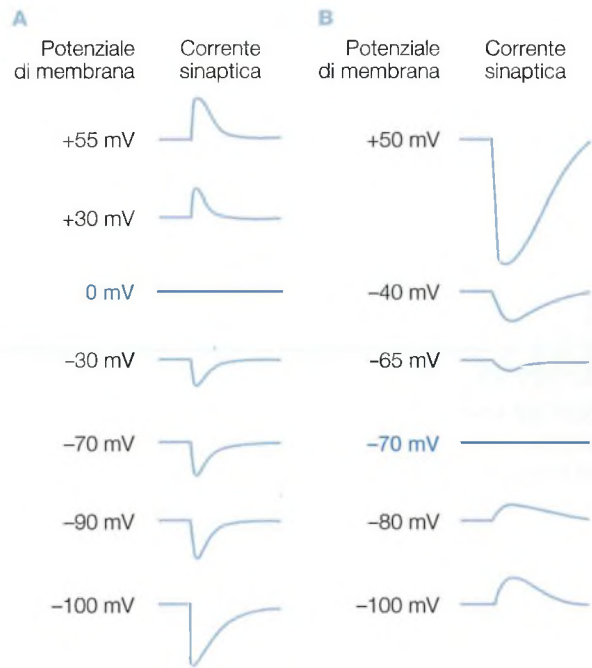


FIGURA 12.7 La direzione e l'entità delle correnti che passano attraverso i recettori-canale dipendono dal potenziale di membrana. **A.** Schema del variare della corrente sinaptica dopo attivazione dei recettori nicotinici da parte dell'ACh. La variazione della corrente sinaptica è dovuta alla somma delle variazioni di corrente in ogni singolo canale. Il canale dell'AChR è ugualmente permeabile a Na⁺ e K⁺ che si muovono quindi secondo il loro gradiente elettrochimico. Al potenziale di riposo di -90 mV l'attivazione dei recettori nicotinici da parte dell'ACh dà luogo a una corrente depolarizzante entrante dovuta all'ingresso degli ioni Na⁺. A potenziali di membrana più positivi (-70, -30 mV) la corrente entrante portata dagli ioni Na⁺ diminuisce progressivamente e aumenta la corrente uscente di K⁺. Questa porta a una diminuzione della complessiva corrente sinaptica. Al potenziale di membrana di 0 mV in ogni singolo canale la corrente entrante di Na⁺ è bilanciata da una pari corrente uscente di K⁺ e quindi la corrente sinaptica risultante è uguale a 0. A potenziali più positivi prevale l'uscita di K⁺ e quindi la direzione della corrente sinaptica è invertita. **B.** Schema del variare delle correnti al Cl⁻ al variare del potenziale di membrana. Al potenziale di membrana di -65 mV, in seguito all'attivazione dei recettori-canale permeabili al Cl⁻ si ha una corrente iperpolarizzante entrante che aumenta in ampiezza se la cellula viene progressivamente depolarizzata (-40, +50 mV). Al potenziale di membrana di -70 mV che è uguale al potenziale di equilibrio del Cl⁻ non c'è nessuna corrente che attraversa il canale. A potenziali inferiori (tra -80 e -100 mV) si ha una corrente uscente depolarizzante che riporta il potenziale della cellula al potenziale di equilibrio del Cl⁻ di -70 mV. La situazione può essere diversa in quelle cellule in cui il potenziale d'equilibrio del Cl⁻ è diverso da -70 mV.

Lentità della risposta recettoriale è anche dipendente dalla durata della stimolazione: nel caso dell'AChR, il trattamento con agonisti non-idrolizzabili (ad esempio, succinilcolina) o con farmaci che bloccano la degradazione dell'ACh (anticolinesterasici) comporta una stimolazione continua del recettore; in queste condizioni, ogni singola molecola di AChR fluttua rapidamente tra uno stato conduttivo e uno non conduttivo per diverse centinaia di millisecondi, finché entra in uno stato non-conduttivo in cui non risponde più all'agonista: questo fenomeno è detto desensitizzazione. Nello stato desensitizzato il recettore lega l'ACh con un'affinità circa 1000 volte superiore, ma rimane comunque non conduttivo (vedi Capitolo 6).

La desensitizzazione è una proprietà intrinseca alla molecola del recettore; tuttavia, come abbiamo visto in uno dei paragrafi precedenti, la velocità con cui il processo di desensitizzazione si instaura e coinvolge tutte le molecole di recettore è finemente regolato dalla cellula mediante fosforilazioni specifiche indotte da secondi messaggeri.

Le proprietà ioniche e farmacologiche di un recettore-canale dipendono dalla sua composizione in subunità

Si è già visto come differenze in punti strategici nella sequenza amminoacidica della regione M2 di subunità di recettori per lo stesso neurotrasmettitore conferiscano selettività ioniche specifiche al recettore-canale di cui fanno parte. Anche proprietà quali la conduttanza, tempo di apertura del canale, sensibilità alla desensitizzazione e capacità di legare agonisti e antagonisti possono variare considerevolmente per uno stesso recettore in funzione del tipo di subunità che lo compone.

Un esempio tipico dell'importanza della composizione in subunità nel definire queste proprietà è costituito dal recettore nicotinic. Nel muscolo embrionale questo recettore è costituito dalle subunità α_1 , β_1 , γ e δ (stechiometria: 2, 1, 1, 1) e ha un tempo medio d'apertura relativamente lungo (4-11 ms) ma bassa conduttanza, mentre nell'adulto la subunità γ è sostituita dalla subunità ϵ e il recettore ha un tempo di apertura breve (1-5 ms) e alta conduttanza (Figura 12.8).

Nel SNC sono presenti isoforme diverse dell'AChR, che differiscono sia in termini di selettività ionica, che di sensibilità agli agonisti e agli antagonisti. nAChR è un eteropentamero costituito da 2 subunità α e 3 subunità β . Sono state identificate 9 subunità α (α_{2-10}) e 3 subunità β (β_{2-4}) diverse e specifiche per le cellule nervose. L'isoforma più diffusa nel SNC è il complesso recettoriale contenente le subunità α_4 e β_2 , sensibile ad ACh e nicotina, ma non bloccabile dall'antagonista α -bungarotossina. Recentemente è stato dimostrato che nello stesso recettore con le subunità α_4 e β_2 possono coesistere altre subunità, quali le subunità α_2 e α_5 , e/o α_6 che ne modificano le caratteristiche farmacologiche e funzionali. In diverse aree del SNC è inoltre presente il recettore omomero contenente la subunità α_7 che conferisce al recettore di cui fa parte sia la sensibilità alla α -bungarotossina che una alta permeabilità allo ione Ca^{2+} (vedi Capitolo 34).

Un altro esempio è rappresentato Gly-R: nel midollo

spinale, dove alta è la sensibilità alla stricnina, prevale il recettore contenente la subunità α_1 , mentre nelle aree più rostrali, dove la sensibilità alla stricnina è inferiore, sono espressi recettori contenenti le subunità α_2 e α_3 .

Un ulteriore esempio di modifica delle proprietà recettoriali dipendente dalla composizione in subunità è fornito dal recettore GABA_A. Infatti in vitro bastano subunità α e β per formare un recettore pentamerico funzionante aperto dal legame del GABA alla subunità β ; ma nello stesso recettore, per ottenere la sensibilità alle benzodiazepine, che si legano alla subunità α , è indispensabile la presenza della subunità γ che, allostericamente, modula il recettore e lo rende sensibile all'azione di queste (vedi Capitolo 37).

I meccanismi cellulari e molecolari che controllano questa eterogeneità recettoriale non sono ancora chiari.

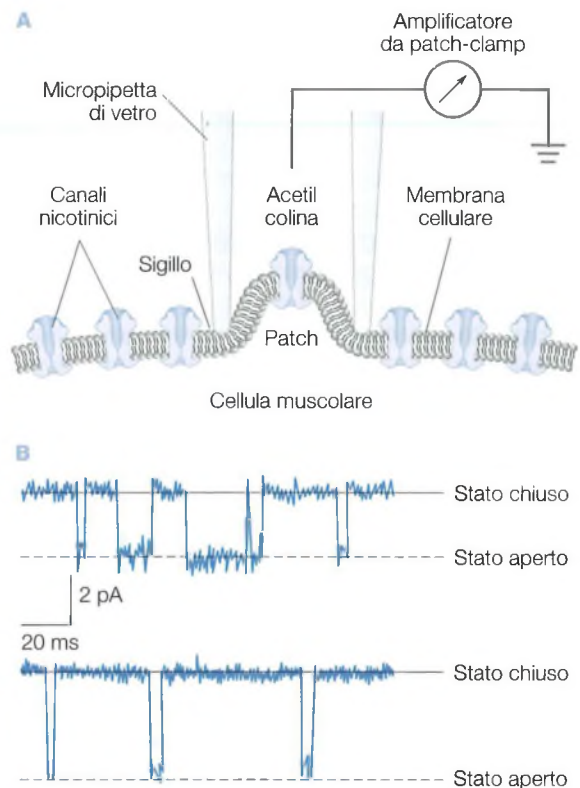


FIGURA 12.8 Le proprietà funzionali del recettore nicotinic muscolare cambiano durante lo sviluppo. **A.** Schema di un'unità di patch clamp utilizzata per determinare le proprietà biofisiche del singolo canale dell'AChR. Una micropipetta di vetro con un diametro di $1 \mu\text{m}$ è pressata contro la membrana di un muscolo scheletrico a cui è stato rimosso il tessuto connettivo. La micropipetta è riempita con una soluzione fisiologica e contiene un elettrodo di metallo che è connesso con uno speciale circuito elettrico che misura la corrente che fluisce attraverso la membrana sotto la punta della pipetta. **B.** Sono riportati due esempi di conduttanza di singolo canale registrati in canali attivati dall'ACh nel muscolo fetale o adulto. Nel muscolo fetale (traccia superiore) che esprime un recettore costituito dalle subunità $\alpha_1\beta_1\gamma\delta$ il canale ha una minore conduttanza (40 pS) e un tempo di apertura lungo (11 ms). Nel muscolo adulto che esprime un recettore $\alpha_4\beta_1\epsilon\delta$ (traccia inferiore) il canale ha una conduttanza maggiore (59 pS), ma un tempo di apertura minore (6,6 ms).

La pluralità di recettori che si può ottenere con la combinazione di diverse subunità, permette alla cellula di variare i parametri biologici importanti della funzionalità recettoriale, come la localizzazione subcellulare (diffusa, presinaptica o elevata nelle densità postsinaptiche), la velocità di desensitizzazione e le proprietà ioniche, che giocano un ruolo fondamentale nella formazione e nel mantenimento dei contatti sinaptici. Inoltre l'eterogeneità recettoriale può essere uno degli strumenti attraverso i quali le cellule nervose modulano l'eccitabilità e l'intensità delle risposte in funzione degli stimoli a cui sono esposte, fenomeni che sono alla base dei processi di apprendimento e memoria.

Cross-talk con altri sistemi recettoriali

Ciascuna cellula ha un suo set di recettori-canale che utilizza per introdurre ioni, per integrare i segnali che le arrivano e, nelle cellule nervose, per propagare il potenziale d'azione e rilasciare neurotrasmettitori. Questi recettori coesistono nella cellula con molti altri recettori e canali ionici e possono essere modulati nella loro attività non solo da secondi messaggeri, dalla interazione con le subunità $\beta\gamma$ delle G proteine o da modificazioni post-traduzionali, ma anche per interazione fisica diretta con altri recettori.

Recentemente è stata dimostrata un'interazione fisica e/o funzionale per molti di questi recettori-canale. Ad esempio a livello dei neuroni del sistema enterico, che controllano la funzione gastrointestinale, sono coespressi i recettori P2X e $\alpha_3\beta_4$ nicotinici. La simultanea attivazione di queste due classi di recettori produce una corrente entrante nei neuroni che è minore della somma delle correnti ottenute stimolando direttamente ogni singolo tipo di recettore, indicando quindi che esiste un'inibizione del recettore P2X da parte del recettore nicotinic neuronale $\alpha_3\beta_4$, attraverso una possibile interazione fra i due recettori.

L'interazione diretta di recettori-canale è stata dimostrata anche con recettori appartenenti alla classe dei recettori accoppiati a G proteine. Nei neuroni striatali il recettore della dopamina D1 interagisce direttamente e selettivamente con la subunità NR1 del recettore NMDA e questa interazione determina una modificazione del traffico intracellulare del recettore D1. Nei neuroni dopaminergici è stata inoltre dimostrato che il recettore D2, localizzato a livello presinaptico nei terminali, è in grado di interagire fisicamente con i nAChR eteromerici e l'interazione di queste due classi di recettori modula il rilascio di dopamina nello striato.

Questi studi indicano chiaramente che i meccanismi attraverso i quali i neurotrasmettitori producono i loro effetti nelle cellule bersaglio sono molto complessi, ancora poco conosciuti e variabili da cellula a cellula e che la risposta della singola cellula al neurotrasmettitore dipende anche dai livelli di integrazione e di coordinazione delle diverse vie di segnalazione intracellulari (vedi anche Capitolo 11).

Meccanismi d'azione dei farmaci che modulano l'attività dei recettori-canale

Farmaci capaci di competere con il neurotrasmettitore per il legame sul suo sito di interazione possono fungere da agonisti o antagonisti a seconda della loro capacità di indurre o meno la modificazione conformazionale necessaria per l'apertura del canale ionico intrinseco nella macromolecola recettoriale. In questo modo è possibile modulare l'intensità della risposta recettoriale e dei fenomeni biologici che a essa seguono.

L'attività del recettore può essere modulata anche da farmaci che si legano in siti diversi da quelli del neurotrasmettitore, chiamati siti allosterici (Figura 12.9). L'occupazione di questi siti può avere effetti non solo sulla cinetica di legame del neurotrasmettitore, ma anche sull'apertura e sulla chiusura del canale ionico e sulla velocità del passaggio allo stato desensitizzato. Nel recettore GABA_A, farmaci, come le benzodiazepine, che si legano alla subunità γ , modulano il legame del GABA alla subunità β del recettore e il processo di apertura del canale è regolato da farmaci quali gli steroidi, i barbiturici e la picrotossina; inoltre il canale allo stato aperto può essere occluso dalla penicillina e le benzodiazepine possono ridurre la velocità di entrata del recettore nello stato desensitizzato.

Nella figura 12.9 sono mostrati alcuni esempi di farmaci che si legano a siti allosterici, e che in questo modo modulano il recettore nicotinic.

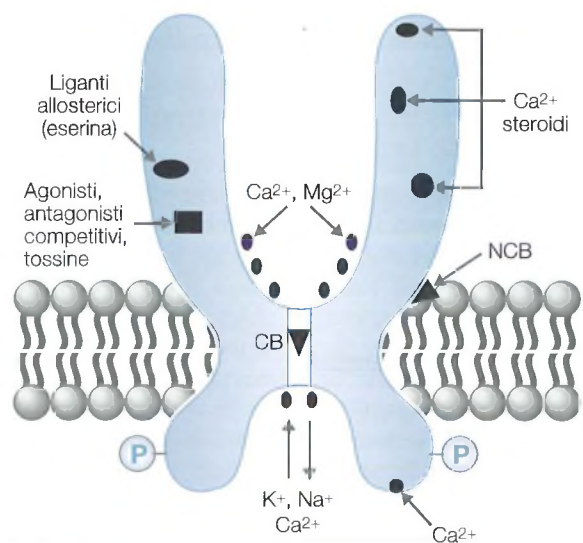


FIGURA 12.9 Rappresentazione schematica del sito di legame di agonisti e antagonisti e dei numerosi siti allosterici che modulano la funzionalità del recettore nicotinic. I siti allosterici che legano il Ca²⁺, gli steroidi, l'eserina, la galantamina e i bloccanti non competitivi sono distribuiti sulla parte esterna del canale, nel canale stesso, all'interfaccia con la membrana e nella parte citoplasmatica del recettore. P: sito di fosforilazione; CB: bloccanti del canale; NCB: bloccanti non competitivi.

Il significato fisiologico di questi siti allosterici non è noto, ma è probabile che almeno alcuni di essi rappresentino dei siti di legame per sostanze endogene ancora sconosciute. Questo è stato recentemente dimostrato per una famiglia di proteine (lynx) secrete dalle cellule che hanno una struttura comune a quella delle α neurotossine dei serpenti elapidi (i primi ligandi del recettore nicotinic). In particolare la proteina lynx1, legandosi al recettore nicotinic $\alpha_4\beta_2$, ne inibisce la funzione, perché diminuisce l'affinità del recettore all'ACh, ne accelera la desensitizzazione e ne rallenta il recupero dalla desensitizzazione.

Alcuni dei farmaci attivi su siti allosterici diversi da quelli per i neurotrasmettitori possono essere importanti in terapia proprio in virtù del loro meccanismo d'azione (ad esempio, barbiturici e benzodiazepine). Per altri, gli effetti possono essere considerati secondari, ma non per questo meritevoli di minor attenzione. Ad esempio molti ormoni steroidei (il desametasone, il prednisolone, l'idrocortisone, e il progesterone) inibiscono il recettore

nicotinic muscolare in modo rilevante. Questo ha un risvolto anche nella prassi terapeutica qualora si instauri una terapia immunosoppressiva con corticosteroidi in un paziente affetto da miastenia grave, una malattia autoimmune diretta contro l'AChR, caratterizzata da una diminuzione del numero di recettori postsinaptici. È infatti necessario porre molta attenzione, soprattutto all'inizio della terapia, per non indurre episodi di paralisi dei muscoli respiratori dovuti al blocco da parte dei farmaci steroidei dei pochi recettori nicotinic rimasti. Anche l'eserina (Figura 34.3), conosciuta come un potente inibitore delle colinesterasi, e talvolta usata nella terapia della miastenia grave, può potenziare l'attività dell'AChR legandosi a un sito allosterico: l'effetto di questo farmaco è quindi dato da due effetti sinergici, il rallentamento della degradazione del neurotrasmettitore e l'attivazione diretta del recettore. Farmaci allosterici che attivano i recettori nicotinic neuronali sono allo studio come possibile intervento terapeutico nella malattia di Alzheimer (vedi Capitolo 34).

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I recettori-canale sono tra le molecole più importanti per regolare la comunicazione rapida tra cellule e l'omeostasi ionica intracellulare.
- ▶ Essi possono essere modulati da vari neurotrasmettitori o nucleotidi attraverso un legame in siti extra- o intracellulari.
- ▶ Sono proteine complesse costituite da varie subunità e le proprietà biofisiche e farmacologiche di questi recettori dipendono dalle subunità che li compongono.
- ▶ La struttura/forma tridimensionale di questi recettori è molto simile, pur essendo costruita con strutture molecolari molto diverse.
- ▶ La loro risposta funzionale dipende dalla loro localizzazione e dallo stato di sensitizzazione/desensitizzazione che può essere influenzato dalle modificazioni post-traduzionali.
- ▶ La loro attività può essere influenzata da farmaci che si legano a siti ortosterici o allosterici attivandoli o inibendoli.

Bibliografia essenziale

- ▶ Browne LE, Jiang LH, North RA. New structure enlivens interest in P2X receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31:229-37.
- ▶ Cukkemane A, Seifert R, Kaupp UB. Cooperative and uncooperative cyclic-nucleotide-gated ion channels. *Trends Biochem Sci* 2011;36:55-64.
- ▶ Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:482-91.
- ▶ Miller PS, Smart TG. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sc* 2010; 31:161-74.
- ▶ Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 2008;60:243-60.
- ▶ Sine SM, Engel AG. Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 2006; 440:448-55.
- ▶ Taly A, Corringer PJ, Guedin D et al. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8:733-50.
- ▶ Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 2010;62:405-96.

I recettori accoppiati alle proteine G

CAPITOLO

13

Lucia Vallar, Lucia Vicentini

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le nozioni fondamentali sulle caratteristiche strutturali e funzionali dei recettori accoppiati alle proteine G
- ▶ Acquisire le nozioni fondamentali sulla struttura e sulla funzione delle proteine G
- ▶ Acquisire le conoscenze fondamentali relative ai sistemi dell'adenilato ciclastasi e della fosfolipasi C
- ▶ Conoscere la capacità dei recettori a sette domini transmembrana di interagire con diverse proteine cellulari

Molti ormoni, neurotrasmettitori e altri mediatori chimici inducono le loro risposte legando recettori che si associano a una classe di proteine, le proteine G, in grado di regolare effettori specifici. I recettori accoppiati alle proteine G costituiscono la famiglia più numerosa e diversificata di recettori di membrana. Circa 800 geni codificano per questi recettori nel genoma umano. I recettori accoppiati alle proteine G riconoscono ligandi molto diversi tra loro quali le catecolamine, la serotonina, l'acetilcolina, il GABA, il glutammato, ormoni glicoproteici, ormoni o altri mediatori di natura peptidica e molecole coinvolte nell'adesione cellulare. Vengono inoltre attivati dai fotoni di luce e da stimoli olfattivi e gustativi (Tabella 13.1). Molti GPCR sono "orfani" in quanto è nota la loro sequenza genica ma non sono noti né il ligando endogeno al quale rispondono, né i possibili ruoli fisiopatologici (vedi CD: Approfondimento 13.1. *Recettori orfani*). In risposta a questi stimoli extracellulari, i recettori accoppiati alle proteine G sono in grado di attivare una grande varietà di vie di segnalazione intracellulari che permettono il controllo di molteplici funzioni.

Questa famiglia di recettori ha quindi un'enorme importanza farmacologica. Una percentuale stimata intorno al 30% dei farmaci attualmente in uso ha infatti come bersaglio un recettore accoppiato alle proteine G.

In questo capitolo vengono illustrate le caratteristiche strutturali e funzionali di questi recettori, delle proteine G e di alcuni dei loro effettori. Viene inoltre descritta la capacità dei recettori accoppiati alle proteine G di interagire con altre proteine intracellulari che svolgono funzioni regolatorie o attivano ulteriori vie di segnalazione intracellulare.

Organizzazione molecolare dei recettori accoppiati a proteine G

I recettori accoppiati a proteine G attraversano sette volte la membrana plasmatica

Nonostante i vari recettori accoppiati alle proteine G rivelino una scarsa somiglianza nelle loro sequenze primarie, essi hanno una struttura organizzativa simile. Tutti questi recettori sono costituiti infatti da una catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica e ha l'estremità amminoterminale nello spazio extracellulare e l'estremità carbossiterminale nel citoplasma (Figura 13.1). Per questa ragione vengono anche comunemente chiamati recettori a sette domini transmembrana. Il numero più alto di residui amminoacidici conservati nei vari recettori si riscontra proprio in corrispondenza dei segmenti transmembrana, soprattutto nei tratti più vicini al citoplasma. Le porzioni extracellulari e citoplasmatiche della molecola possono essere invece molto diverse. Sulla base dell'analisi filogenetica sono state identificate nell'uomo cinque famiglie principali di recettori accoppiati alle proteine G (vedi CD: Approfondimento 13.2. *Struttura e modificazioni conformazionali dei recettori accoppiati alle proteine G*). Tra queste, la famiglia della rodopsina è di gran lunga la più numerosa e meglio caratterizzata. Oltre alla rodopsina, che è il recettore per i fotoni presente nella retina, questa famiglia comprende i recettori per le catecolamine e la serotonina, i recettori muscarinici per l'acetilcolina, i recettori per l'istamina, i recettori per gli ormoni glicoproteici, i recettori per diversi peptidi e

TABELLA 13.1 Esempi di recettori accoppiati alle proteine G*

Recettore per	Proteina G	Effettore	Recettore per	Proteina G	Effettore
Neurotrasmettitori			Vasopressina		
Catecolamine			V ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
Adrenergico β ₁ , β ₂ , β ₃	G _s	↑ Adenilato ciclasi	V ₂	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Adrenergico α ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C	Glucagone	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Adrenergico α ₂	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↓ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	Secretina	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Dopamina			VIP	G _s	↑ Adenilato ciclasi
D ₁	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Ormone paratiroideo (PTH)	G _s	↑ Adenilato ciclasi
D ₂	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺		G _q	↑ Fosfolipasi C
Serotonina			Calcitonina	G _s	↑ Adenilato ciclasi
5-HT ₁ , 5-HT ₅	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺		G _q	↑ Fosfolipasi C
5-HT ₂	G _q	↑ Fosfolipasi C	Altri mediatori		
5-HT ₄ , 5-HT ₆ , 5-HT ₇	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Istamina		
Acetilcolina			H ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
Muscarinico M ₁ , M ₃ , M ₅	G _q	↑ Fosfolipasi C	H ₂	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Muscarinico M ₂ , M ₄	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	H ₃ , H ₄	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↓ Canali al Ca ²⁺
GABA			Adenosina		
GABA _B	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	A ₁ , A ₃	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺
Glutammato			A ₂	G _s	↑ Adenilato ciclasi
mGlu ₁ , mGlu ₅	G _q	↑ Fosfolipasi C	ATP		
mGlu ₂ , mGlu ₃ , mGlu ₄ , mGlu ₆ , mGlu ₇ , mGlu ₈	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
Oppioidi	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃ , P2Y ₁₄	G _i	↓ Adenilato ciclasi
Cannabinoidi	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	Angiotensina II		
Ormoni			AT ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
ACTH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Bradichinina	G _q	↑ Fosfolipasi C
LH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Trombina		
FSH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	PAR-1	G _i	↓ Adenilato ciclasi
TSH	G _s	↑ Adenilato ciclasi		G _q	↑ Fosfolipasi C
	G _q	↑ Fosfolipasi C		G ₁₂	↑ RhoGEF
GHRH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	PAR-4	G _q	↑ Fosfolipasi C
CRH	G _s	↑ Adenilato ciclasi		G ₁₂	↑ RhoGEF
GnRH	G _q	↑ Fosfolipasi C	Acido lisofosfatidico		
TRH	G _q	↑ Fosfolipasi C	LPA ₁ , LPA ₂ , LPA ₄	G _i	↓ Adenilato ciclasi
Somatostatina	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺		G _q	↑ Fosfolipasi C
				G ₁₂	↑ RhoGEF
			LPA ₃	G _i	↓ Adenilato ciclasi
				G _q	↑ Fosfolipasi C
			LPA ₅	G _q	↑ Fosfolipasi C
				G ₁₂	↑ RhoGEF
			Eicosanoidi		
			Prostaglandina PGE₂		
			EP ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
			EP ₂ , EP ₄	G _s	↑ Adenilato ciclasi
			EP ₃	G _i	↓ Adenilato ciclasi
			Prostaglandina PGF _{2α}	G _q	↑ Fosfolipasi C
			Prostaciclina	G _s	↑ Adenilato ciclasi
			Trombossano A ₂	G _q	↑ Fosfolipasi C
				G ₁₂	↑ RhoGEF
			Fotoni		
			Rodopsina	G _t	↑ cGMP fosfodiesterasi

* Sono indicati le principali proteine G e i principali effettori regolati da diversi recettori o specifici sottotipi recettoriali. Si noti che un determinato recettore può attivare più di un tipo di proteina G e una determinata proteina G può regolare più di un effettore.

ACTH: ormone adrenocorticotropo; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolo-stimolante; TSH: ormone tireotropo; GHRH: ormone stimolante il rilascio di GH; CRH: ormone stimolante il rilascio di ACTH; GnRH: ormone stimolante il rilascio delle gonadotropine; TRH: ormone stimolante il rilascio di TSH; ↑: stimolazione; ↓: inibizione

molti altri. Tutti i membri della famiglia della rodopsina presentano motivi strutturali comuni. Nella maggior parte dei casi questi recettori possiedono un'estremità aminoterminale extracellulare piuttosto breve rispetto a quella presente nei recettori delle altre famiglie.

Il sito di legame per il mediatore chimico e il sito di interazione con la proteina G sono localizzati in porzioni distinte della molecola recettoriale

È molto importante per poter disegnare molecole che regolano la funzione dei recettori stabilire le regioni coinvolte nel legame al mediatore chimico, le regioni importanti per il passaggio a una conformazione "attiva" e quelle responsabili dell'interazione con le proteine G. Una serie di studi ha dimostrato che i diversi tipi di ligandi endogeni utilizzano diverse modalità di legame con i rispettivi recettori (Figura 13.1). Nel caso delle catecolamine, della serotonina, dell'istamina, dell'acetilcolina e di altri ligandi di piccole dimensioni, alcune o tutte e sette le regioni idrofobiche transmembrana del recettore partecipano a formare una "tasca" situata nello spessore della membrana plasmatica e capace di legare il mediatore chimico. In particolare, lo studio dei recettori α e β adrenergici ha permesso di evidenziare alcuni residui fondamentali per il legame con le catecolamine: il gruppo carbossilico di un acido aspartico localizzato nel III territorio transmembrana interagisce con il gruppo amminico delle catecolamine, mentre due residui serinici posti nel V territorio transmembrana sono responsabili del legame con l'anello

catecolico. Nel caso di alcuni peptidi, l'interazione con il recettore sembra invece coinvolgere sia i segmenti transmembrana sia alcuni territori extracellulari. L'estremità aminoterminale extracellulare dei recettori rappresenta il principale sito di legame degli ormoni glicoproteici, come TSH, LH e FSH, e di ormoni peptidici di dimensioni considerevoli. In alcuni casi è stato proposto che l'interazione con l'estremità aminoterminale della molecola recettoriale "orienti" l'ormone verso il suo successivo legame con i segmenti transmembrana e con specifici domini extracellulari. Un'ulteriore e interessante modalità di interazione è utilizzata dal glutammato e dalla trombina e altre proteasi: in entrambi questi casi, l'attivazione del recettore è dovuta a interazione dell'estremità aminoterminale con alcuni territori extracellulari del recettore stesso. Nel caso del glutammato, il neurotrasmettitore "costringe" l'estremità aminoterminale a piegarsi sul suo sito d'interazione con il resto della molecola recettoriale. La trombina e altre proteasi invece riconoscono e tagliano una porzione extracellulare dei loro recettori generando una nuova estremità aminoterminale del recettore stesso che funge da ligando e interagisce intramolecolarmente con alcuni territori extracellulari. Numerosissimi sono i farmaci che agiscono come agonisti o antagonisti dei recettori accoppiati alle proteine G interagendo con il sito di legame per il mediatore chimico. Fino a poco tempo fa non esisteva invece la possibilità di regolare la funzione di questi recettori attraverso un meccanismo allosterico. Le ricerche effettuate negli ultimi anni hanno però indi-

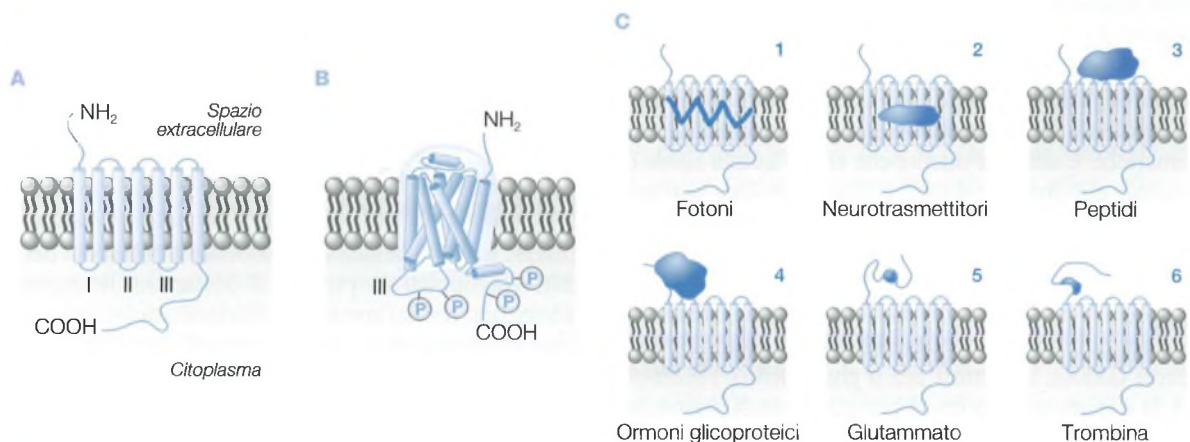


FIGURA 13.1 I recettori accoppiati alle proteine G sono formati da un'unica catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica. **A.** Il terminale amminico della molecola è situato nello spazio extracellulare e quello carbossilico è intracellulare; i sette territori transmembrana sono collegati tra loro da tre segmenti extracellulari e da tre segmenti citoplasmatici (numerati da I a III). **B.** Modello schematico dell'arrangiamento della molecola recettoriale nella membrana dedotto dalla struttura cristallina di alcuni recettori della famiglia della rodopsina. La figura indica anche che il III territorio intracellulare è una delle regioni del recettore importanti per il legame con la proteina G. Sono inoltre schematicamente illustrati i siti di fosforilazione presenti nelle parti citoplasmatiche e nella coda carbossiterminale della molecola recettoriale. **C.** Le diverse strategie utilizzate dai recettori accoppiati alle proteine G per interagire con il ligando. Nel caso particolare della rodopsina, il recettore inattivo è legato, attraverso i suoi segmenti transmembrana, alla molecola *cis*-retinale. I fotoni di luce provocano l'isomerizzazione del *cis*-retinale a *trans*-retinale e una modificazione conformazionale che attiva il recettore (1). Anche diversi neurotrasmettitori e mediatori chimici di piccole dimensioni si legano in corrispondenza di una tasca costituita dai territori transmembrana del recettore (2). Vari peptidi riconoscono invece un sito di legame formato dai segmenti transmembrana e da alcuni territori extracellulari (3). Gli ormoni glicoproteici si legano a una porzione aminoterminale del recettore (4). Nel caso del glutammato (5) e della trombina (6), l'attivazione è dovuta all'interazione delle regioni extracellulari del recettore con un tratto aminoterminale del recettore stesso. Il glutammato induce questo processo legandosi al terminale amminico e costringendolo a piegarsi sulla superficie extracellulare del recettore; la trombina invece "taglia" l'estremità extracellulare generando un nuovo terminale amminico capace di attivare il recettore stesso.

viduato diversi composti che, legandosi a un sito diverso da quello utilizzato dal mediatore chimico, sono in grado di influenzare positivamente o negativamente l'azione di quest'ultimo. Vari modulatori allosterici di diversi tipi di recettori sono attualmente in fase di sperimentazione.

In qualsiasi modo avvenga, il legame del mediatore chimico induce un cambiamento conformazionale nella porzione intracellulare del recettore. Diversi studi hanno dimostrato che, almeno nel caso di alcuni recettori, l'interazione con il ligando determina un riarrangiamento nell'organizzazione spaziale dei segmenti transmembrana che modifica la superficie citoplasmatica della molecola recettoriale consentendo il legame della proteina G (vedi **CD**: Approfondimento 13.2). Si ritiene che il II e il III territorio citoplasmatico siano particolarmente importanti per l'interazione con le proteine G. Questa interazione è il passaggio cruciale per l'ulteriore trasmissione del segnale. Infine, nella parte citoplasmatica della molecola recettoriale e soprattutto nella coda carbossiterminale sono presenti numerosi siti di fosforilazione molto importanti da un punto di vista funzionale. Questi siti sono infatti coinvolti nella fosforilazione del recettore da parte delle chinasi GRK e nel successivo legame delle β -arrestine (vedi Capitolo 6). La formazione del complesso recettore- β -arrestine media sia il fenomeno della desensibilizzazione sia, come verrà illustrato più avanti, la trasduzione di alcuni segnali recettoriali.

■ I recettori accoppiati a proteine G formano dimeri

Il fenomeno della dimerizzazione o oligomerizzazione delle molecole recettoriali è di fondamentale importanza per il funzionamento sia dei recettori intracellulari sia di molti recettori di membrana, come ad esempio i recettori per i fattori di crescita (vedi Capitoli 14 e 20). Nonostante per molto tempo si sia pensato che i recettori accoppiati alle proteine G funzionassero sempre come entità monomeriche, è adesso evidente che anche questa classe di recettori può formare dimeri o oligomeri. Una notevole complessità deriva dalla possibilità che si formino dimeri non solo tra recettori uguali (omodimeri), ma anche tra diversi tipi di recettore per lo stesso ligando o addirittura tra recettori per ligandi diversi (eterodimeri). Sembrano formare omodimeri e/o eterodimeri, ad esempio, i recettori GABA_B, i recettori per il glutammato, i recettori per la dopamina, i recettori per gli oppioidi, i recettori adrenergici β , i recettori per l'adenosina, e i recettori per la somatostatina e la vasopressina.

Vari recettori accoppiati alle proteine G esistono già come dimeri nel reticolo endoplasmatico e in alcuni casi è stato dimostrato che la dimerizzazione è necessaria perché il recettore nascente venga trasportato alla membrana plasmatica. Sembra però che altri recettori siano presenti nella membrana plasmatica come monomeri e la loro dimerizzazione sia un fenomeno dinamico, che può essere ad esempio regolato dall'interazione con il ligando. Per quanto riguarda la capacità del recettore di legare il mediatore chimico e di attivare le proteine G, molti recettori sembrano poter funzionare anche in forma monomerica. Esiste tuttavia la possibilità che un recettore sia funzionalmente attivo solo come dimero. Una delle più significative

osservazioni che la dimerizzazione può essere un prerequisito indispensabile sia per il trasporto del recettore alla membrana sia per il suo normale funzionamento viene dagli studi sul recettore GABA_B. In questo caso, due forme diverse del recettore, GABA_{B1} e GABA_{B2}, formano un eterodimero. È stato dimostrato che il recettore GABA_{B1} può raggiungere la membrana solo se associato al recettore GABA_{B2}. Ed è questo eterodimero la forma recettoriale funzionante. Infatti, il monomero GABA_{B1} è in grado di legare il GABA ma non di interagire con le proteine G, mentre il monomero GABA_{B2} non riconosce il GABA ma attiva efficientemente le proteine G.

Anche se non necessariamente indispensabile per il funzionamento del recettore, la formazione di omodimeri e/o eterodimeri può influenzare in molti modi le caratteristiche del legame con il mediatore chimico, la trasmissione del segnale attraverso le proteine G o altre proprietà recettoriali. Una possibilità è che nell'ambito di un dimero l'interazione di uno dei due recettori con il mediatore chimico modifichi positivamente o negativamente, con un meccanismo di tipo allosterico, la capacità dell'altro recettore di interagire con il ligando. Ad esempio, nel caso degli eterodimeri costituiti dal recettore per l'adenosina A_{2A} e dal recettore dopaminergico D₂ nel sistema nervoso centrale, l'attivazione del recettore A_{2A} inibisce il legame della dopamina e la conseguente attivazione del recettore dopaminergico D₂.

La dimerizzazione dei recettori accoppiati alle proteine G appare quindi un fenomeno complesso e non ancora completamente capito. Ulteriori studi sono necessari per chiarire il ruolo degli omodimeri e degli eterodimeri nel trasporto alla membrana e nel funzionamento dei vari tipi di recettori. Questi studi potrebbero consentire di ampliare notevolmente le possibilità di intervento farmacologico sui recettori accoppiati alle proteine G.

■ Mutazioni recettoriali sono alla base di diverse malattie

Diverse malattie umane sono associate a mutazioni dei recettori accoppiati alle proteine G. Mutazioni che in genere interessano residui amminoacidici localizzati nei segmenti transmembrana o nei territori intracellulari possono rendere questi recettori "costitutivamente" attivati. Esempi di questo tipo di mutazioni sono quelle riscontrate nel recettore per il TSH in un'elevata percentuale di adenomi tiroidei iperfunzionanti e nel recettore per l'LH in bambini affetti da pubertà precoce familiare. Normalmente questi due recettori attivano la proteina G_s con conseguente stimolazione dell'adenilato ciclasi e aumento dei livelli intracellulari di cAMP (vedi oltre). Il cAMP innesca una serie di eventi intracellulari che portano a proliferazione e differenziamento delle cellule tiroidee e produzione di testosterone da parte delle cellule testicolari di Leydig, bersaglio dell'LH. Le mutazioni dei recettori causano l'attivazione delle proteine G anche in assenza di ormone e quindi un persistente aumento dei livelli di cAMP, responsabile della patologia che si sviluppa. In altre malattie sono state invece identificate mutazioni che "inattivano" la molecola recettoriale. Ad esempio, nei pazienti affetti

da diabete insipido congenito sono presenti mutazioni a carico del recettore per la vasopressina. Queste mutazioni, che nella maggior parte dei casi provocano la ritenzione del recettore a livello del reticolo endoplasmatico, portano a perdita della funzionalità recettoriale e quindi all'incapacità del rene di rispondere normalmente alla vasopressina. La più comune causa della retinite pigmentosa autosomica dominante, una malattia caratterizzata da progressiva cecità, sono invece mutazioni che impediscono la normale funzione della rodopsina, il recettore attivato dai fotoni nei bastoncelli della retina.

Accanto a vere e proprie mutazioni geniche, sono stati riscontrati anche numerosi polimorfismi a carico dei loci dei recettori accoppiati alle proteine G, che riguardano tutte le porzioni del recettore e hanno varie conseguenze sulla sua funzionalità e sulla sua capacità di risposta ai farmaci (vedi Capitolo 54).

Organizzazione molecolare e funzione delle proteine G

Le proteine G sono eterotrimeri che legano e idrolizzano GTP

Le proteine G sono associate alla superficie citoplasmatica della membrana e sono eterotrimeri costituiti da tre subunità denominate, in ordine di peso molecolare decrescente α , β e γ . Le subunità β e γ rimangono sempre strettamente associate tra di loro per cui, da un punto di vista funzionale, una proteina G può essere considerata un dimero formato dalla subunità α e dal complesso $\beta\gamma$. Nell'uomo sono state identificate una ventina di diverse subunità α , 6 subunità β e 12 subunità γ . Come verrà illustrato più avanti, le proteine G sono state suddivise in diverse classi sulla base dell'identità della loro catena α . Le subunità β e γ possono combinarsi variamente tra di loro, dando origine a complessi di diversa composizione. In quale misura i vari complessi $\beta\gamma$ siano, nelle cellule, selettivamente associati a determinate subunità α non è ancora chiaro.

Le catene α delle proteine G sono in grado di legare i nucleotidi guanilici, in particolare il GTP, e successivamente di idrolizzarlo grazie a un'attività GTPasica intrinseca. Da questo originano i nomi usati a indicare queste molecole: proteine G, cioè proteine che legano il GTP o, alternativamente, GTPasi. La capacità di legare e idrolizzare il GTP è una caratteristica che le proteine G condividono con altre famiglie di proteine cellulari che hanno spesso una struttura monomerica (per quanto riguarda le GTPasi monomeriche, vedi CD: Approfondimento 13.3. La superfamiglia delle GTPasi monomeriche come possibile bersaglio di farmaci).

Le proteine G trasferiscono il segnale dai recettori agli effettori attraverso un ciclo regolato dal GTP

Le proteine G accoppiano i recettori a effettori specifici, che possono essere enzimi, canali ionici o altre molecole, attraverso un ciclo di attivazione-deattivazione governato dal legame e dall'idrolisi del GTP. Questo ciclo, illustrato nella figura 13.2, può essere così schematizzato: a)

quando il recettore per l'ormone o il neurotrasmettitore non è attivato dal suo agonista specifico, il sito di legame per i nucleotidi guanilici della subunità α è occupato dal GDP e α rimane strettamente associata al complesso $\beta\gamma$ formando un eterotrimerico inattivo; b) in seguito al legame con l'ormone o con il neurotrasmettitore, il recettore interagisce con la proteina G e promuove a livello della subunità α la dissociazione del GDP, che viene sostituito da GTP. Questo determina una modificazione conformazionale della subunità α , che provoca la dissociazione della stessa α dal complesso $\beta\gamma$. A questo punto sia α -GTP sia il complesso $\beta\gamma$ interagiscono con gli effettori, regolandone l'attività; c) il segnale viene "spento" quando l'attività GTPasica di α idrolizza il GTP a GDP e la subunità α -GDP si riassocia al complesso $\beta\gamma$ formando nuovamente l'eterotrimerico inattivo. Le proteine G svolgono quindi la loro funzione passando continuamente da una conformazione inattiva, in cui il nucleotide guanilico legato è il GDP, a una conformazione attiva, in cui è legato GTP.

Al fine di garantire una più rapida disattivazione del segnale, l'idrolisi del GTP da parte delle catene α è regolata da proteine in grado di interagire con queste subunità. In alcuni sistemi, come la stimolazione della fosfolipasi C da parte delle proteine G_{q1} , l'effettore della subunità α accelera l'idrolisi del GTP, agendo quindi come *GTPase Activating Protein* (GAP). È stata inoltre identificata un'intera famiglia di proteine, chiamate *Regulators of G protein Signalling* (RGS) che interagiscono con le subunità α legate al GTP e accelerano notevolmente (anche più di 2000 volte) la velocità di idrolisi del nucleotide, riducendo così la durata del segnale (Figura 13.2). Si conoscono circa 30 proteine RGS. Almeno in alcuni casi, specifiche RGS regolano specifiche subunità α . È importante ricordare che, in aggiunta alla loro capacità di controllare la durata della risposta mediata dalle proteine G, le RGS sembrano svolgere altre funzioni. Queste proteine interagiscono infatti, oltre che con le catene α , anche con molte altre molecole intracellulari e possono in questo modo regolare la generazione di segnali e/o l'integrazione tra segnali diversi.

Caratteristiche strutturali e funzionali delle subunità α

Le subunità α delle diverse proteine G hanno un'elevata omologia di sequenza, che spiega le loro proprietà biochimiche comuni. In particolare, cinque segmenti di pochi amminoacidi, lontani tra di loro, sono altamente conservati in tutte le catene α . Si ritiene che queste sequenze nella struttura tridimensionale della molecola si riuniscano a formare il sito in cui si legano i nucleotidi guanilici. Accanto a sequenze comuni, le varie subunità α possiedono regioni che le differenziano e sono alla base della specificità dell'interazione di ogni α con recettori ed effettori. Delle varie zone attraverso cui le catene α "parlano" con la parte intracellulare del recettore, una delle più importanti è costituita dagli amminoacidi all'estremità carbossiterminale. Diverse regioni nell'ambito della proteina sono invece coinvolte nell'interazione con gli effettori. Sulla base della loro omologia di sequenza e di comuni

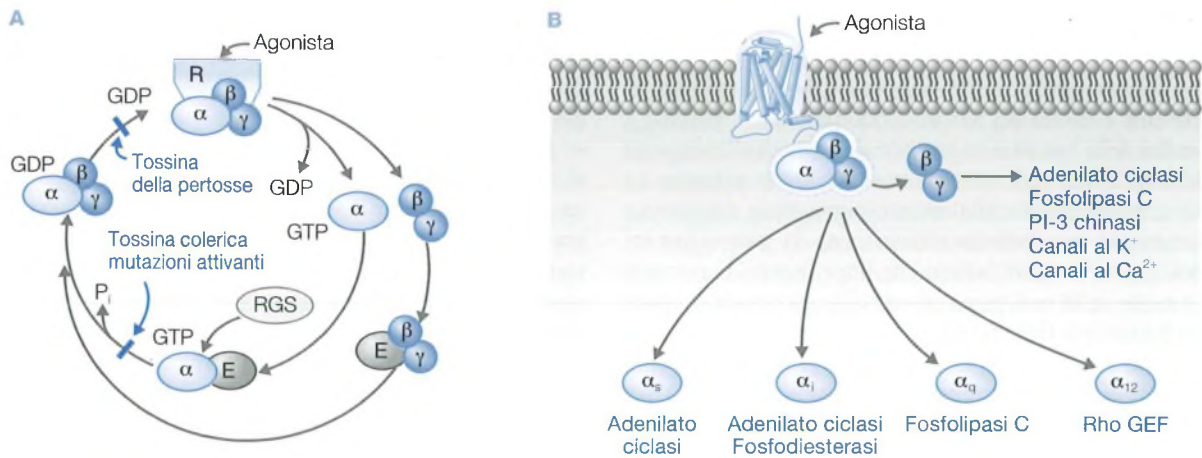


FIGURA 13.2 Traduzione del segnale da parte delle proteine G. **A.** Ciclo delle proteine G. Quando il recettore (R) non è attivato, la proteina G è in forma trimerica e porta, nel sito di legame per i nucleotidi guanilici, una molecola di GDP. Il legame dell'agonista al recettore stimola la formazione del complesso recettore-proteina G e induce lo scambio GDP-GTP. In seguito a questo, la proteina G si separa dal recettore e la subunità α si dissocia dal complesso $\beta\gamma$. Sia la subunità α -GTP sia il complesso $\beta\gamma$ si legano a questo punto agli effettori (E) modulandone l'attività. La subunità α è anche dotata di attività GTPasica e quindi idrolizza il GTP a GDP; in questo modo perde la capacità di legare l'effettore e si riassocia al complesso $\beta\gamma$. Le proteine RGS accelerano notevolmente la velocità di idrolisi del GTP da parte delle subunità α . Le tossine batteriche del colera e della pertosse sono in grado di modificare la subunità α , alterando il normale funzionamento del ciclo della proteina G; mutazioni individuate in tumori umani attivano le subunità α inibendone l'attività GTPasica. **B.** Effettori principali delle subunità α e dei complessi $\beta\gamma$ delle proteine G. Sulla base di caratteristiche strutturali e funzionali le subunità α sono state suddivise in quattro classi: α_s , α_i , α_q , e α_{12} . Le subunità α_s e α_i regolano l'adenilato ciclasi. Il gruppo delle subunità α_i comprende α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , α_{i6} e la trasducina, o α_t , che, nella retina, attiva una fosfodiesterasi per il cGMP. Le subunità di tipo α_q (α_{q1} , α_{q11} , α_{q14} e α_{q16}) stimolano la fosfolipasi C mentre la classe di catene α_{12} , che comprende α_{12} e α_{13} , regola fattori di scambio dei nucleotidi guanilici per la GTPasi Rho (Rho GEF). Le subunità α delle proteine G sono rappresentate nel citoplasma solo per chiarezza del disegno, mentre fisiologicamente sono localizzate alla membrana citoplasmatica.

proprietà funzionali, le subunità α delle proteine G sono state suddivise in quattro classi (Figura 13.2).

1. La prima classe è rappresentata da α_s , che accoppia un vasto gruppo di recettori, tra cui il recettore β -adrenergico e il recettore per il TSH, all'attivazione dell'adenilato ciclasi, che determina la produzione di cAMP.
2. La seconda classe comprende α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , e α_{i6} . Queste subunità interagiscono con molti recettori per neurotrasmettitori o peptidi, quali il recettore α_2 -adrenergico e il recettore per la somatostatina, e sono in grado di inibire l'adenilato ciclasi. Alla stessa classe di catene α appartiene anche la trasducina, o α_t , che è espressa nella retina e accoppia la rodopsina alla stimolazione di una fosfodiesterasi che idrolizza il cGMP.
3. Un terzo gruppo di catene α , che comprende α_q e altre subunità con azione simile, si associa a recettori quali il muscarinico M_1 e il recettore per il TRH e media la stimolazione della fosfolipasi C, che genera i due secondi messaggeri inositolo 1,4,5-trisfosfato (InsP_3) e diacilglicerolo (DAG).
4. Le subunità α_{12} e α_{13} costituiscono una quarta classe di catene α . Queste subunità interagiscono con recettori specifici, come i recettori per la trombina e il recettore per il trombossano A_2 , e attivano diversi fattori di scambio dei nucleotidi guanilici per la GTPasi monomericamente Rho, determinando così un'attivazione di questa proteina coinvolta in varie funzioni cellulari (vedi CD: Approfondimento 13.3).

Alcune subunità α sono bersaglio dell'azione di tossine batteriche

Le tossine prodotte dai batteri responsabili del colera e della pertosse agiscono alterando il normale funzionamento delle subunità α di alcune proteine G. Entrambe queste tossine sono ADP-ribosil-transferasi. La tossina colerica è in grado di ADP-ribosilare α_s in corrispondenza di un'arginina localizzata in una delle regioni coinvolte nell'idrolisi del GTP. La conseguenza funzionale di questa modificazione è l'inibizione dell'attività GTPasica della proteina, che rimane quindi "bloccata" nella sua forma attiva (Figura 13.2), inducendo una stimolazione persistente dell'adenilato ciclasi e una continua produzione di cAMP (responsabile a sua volta dell'abnorme perdita di elettroliti e acqua da parte delle cellule intestinali caratteristica del colera). Substrato della tossina della pertosse sono invece le proteine del gruppo G_i/G_o , che sono caratterizzate dalla presenza di una cisteina nella regione di interazione con il recettore all'estremità carbossiterminale. L'ADP-ribosilazione di questo residuo impedisce l'attivazione della proteina G da parte dei recettori (Figura 13.2). I segnali che vengono trasmessi attraverso G_i e G_o sono quindi "interrotti" e si ritiene che questo contribuisca al quadro clinico della malattia.

Mutazioni delle subunità α sono presenti in malattie genetiche e in tumori del sistema endocrino

Alterazioni del normale funzionamento delle subunità α delle proteine G sono alla base di alcune condizioni patologiche. Nello pseudoipoparatiroidismo di tipo Ia (osteodistrofia ereditaria di Albright), una malattia autosomica dominante caratterizzata da resistenza al PTH e ad altri ormoni che agiscono attraverso recettori accoppiati a G_s , sono state riscontrate mutazioni che determinano un difetto di espressione di α_s e impediscono quindi la normale risposta cellulare. Le catene α delle proteine G possono essere inoltre bersaglio di mutazioni attivanti coinvolte nello sviluppo di tumori. Mutazioni di residui specifici di α_s che causano inibizione dell'attività GTPasica, e quindi attivazione costitutiva della proteina con un meccanismo identico a quello della tossina colerica (Figura 13.2), sono state identificate in un'elevata percentuale di adenomi ipofisari secernenti GH, in alcuni tumori tiroidei, in altri tipi di tumori e nella sindrome di McCune Albright, una malattia genetica caratterizzata da endocrinopatie multiple. Il gene mutante della catena α_s , che è stato chiamato oncogene *gsp*, provoca la crescita e l'aumentata attività funzionale di alcuni tipi cellulari attraverso la continua produzione di cAMP, come descritto sopra nel caso delle mutazioni che attivano il recettore per il TSH. Mutazioni attivanti analoghe a quelle presenti in *gsp* sono state riscontrate nel gene che codifica per α_{12} in alcuni tumori dell'ovaio e del surrene e nel gene che codifica per α_q in neoplasie melanocitiche.

Il complesso $\beta\gamma$

Il complesso $\beta\gamma$ svolge diverse funzioni nella trasmissione dei segnali attraverso le proteine G. Le subunità $\beta\gamma$ sono necessarie per l'interazione della proteina G con i recettori, che sono in grado di legare con alta affinità solamente l'eterotrimerico $\alpha\beta\gamma$ -GDP e non α -GDP. In seguito all'attivazione recettoriale, il complesso $\beta\gamma$ agisce poi come molecola "segnale" capace di interagire direttamente con effettori specifici (Figura 13.2). Le subunità $\beta\gamma$ sono in grado di regolare diversi enzimi: stimolano alcune forme di fosfolipasi C, stimolano o inibiscono forme specifiche di adenilato ciclasi e attivano la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI-3-chinasi) che genera fosfatidilinositolo 3,4,5-trisfosfato (PIP₃). Inoltre, determinano inibizione di canali per il Ca²⁺ e attivazione di specifici canali per il K⁺, tra cui quello presente nelle cellule pacemaker del cuore. Quest'ultimo è aperto dall'attivazione del recettore muscarinico per l'acetilcolina di tipo M₂ accoppiato alle proteine G_i; l'uscita di K⁺ attraverso questo canale contrasta l'effetto depolarizzante della corrente *I_f* caratteristica delle cellule pacemaker cardiache e ha quindi un effetto bradicardizzante. È stato infine dimostrato che le subunità $\beta\gamma$ reclutano alla membrana le chinasi GRK responsabili della fosforilazione delle regioni citoplasmatiche dei recettori (vedi in precedenza e Capitolo 6). La selettività con cui le varie combinazioni di subunità β e γ interagiscono con i diversi recettori ed effettori, o con altre molecole, non è ancora completamente chiarita.

Attraverso le proteine G un recettore può regolare diversi effettori

Attraverso l'accoppiamento alle proteine G, un singolo recettore può regolare più effettori e quindi trasmettere all'interno della cellula una serie di segnali coordinati tra di loro. Diversi meccanismi sono alla base di questa molteplicità di risposta. Una prima possibilità si ha quando il recettore interagisce con una determinata proteina G e quest'ultima è in grado poi di regolare più di una molecola effettrice. In alcuni casi una proteina G attivata può controllare un effettore attraverso la subunità α -GTP e un secondo effettore utilizzando il complesso $\beta\gamma$. Inoltre, sia alcune catene α che il complesso $\beta\gamma$, sembrano poter essere multifunzionali per quanto riguarda la loro interazione con gli effettori. Così, ad esempio, recettori accoppiati alle proteine G_i e G_o, come i recettori dopaminergici D₂ e i recettori per la somatostatina, sono in grado di indurre inibizione dell'adenilato ciclasi attraverso le subunità α_i e attivazione di canali al K⁺ e inibizione di canali al Ca²⁺ attraverso i complessi $\beta\gamma$ liberati dagli eterotrimeri (Tabella 13.1). Infine, in molti casi una determinata molecola recettoriale è capace di "parlare" con più di un tipo di proteina G (Tabella 13.1). Ad esempio, alcuni recettori, come quelli per TSH, LH, PTH e calcitonina, sono accoppiati a G_s, e quindi alla stimolazione dell'adenilato ciclasi, ma mediano anche l'idrolisi dei fosfoinositidi interagendo con G proteine di tipo G_q. L'attivazione dei recettori PAR₁ da parte della trombina determina invece l'attivazione di proteine di tipo G_i, G_q e G₁₂. Si ritiene che, in questi casi, siano diverse conformazioni attive del recettore a mediare il legame con le diverse proteine G. Esistono infatti molecole capaci di agire come agonisti che inducono preferenzialmente l'interazione del recettore con una particolare proteina G. Ad esempio, nel caso del recettore PAR₁ alcuni peptidi favoriscono l'attivazione di G_q rispetto a quella delle proteine G₁₂. Queste osservazioni potrebbero aprire la strada allo sviluppo di farmaci "selettivi" o "biased" per una specifica via di segnalazione recettoriale.

I sistemi effettori

L'attivazione di effettori specifici traduce il segnale generato dall'interazione recettore-proteina G in un messaggio cellulare. Oltre agli effettori che sono stati descritti in precedenza, altre molecole sembrano poter agire sotto il controllo delle proteine G. Queste comprendono: la fosfolipasi D che porta alla formazione di acido fosfatidico e di DAG, la fosfolipasi A₂ che libera acido arachidonico (vedi Capitolo 43), specifiche tirosinchinasi, e proteine GAP per la GTPasi monomericamente Rap (vedi **CD**: Approfondimento 13.3). Attraverso il controllo di una così grande varietà di effettori, le proteine G sono in grado di regolare molteplici vie di segnalazione intracellulare. In particolare, è stato dimostrato che sia tutti i tipi di subunità α sia il complesso $\beta\gamma$ delle proteine G possono determinare, attraverso vari meccanismi, la stimolazione della cascata delle *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK) che viene attivata dai recettori per i fattori di crescita ad attività tirosinchinasica e da altre classi recettoriali e svolge un

ruolo fondamentale nella regolazione della crescita e del differenziamento (vedi Capitolo 10). In questo capitolo vengono descritte le caratteristiche di due degli effettori enzimatici delle proteine G meglio caratterizzati: l'adenilato ciclasi e la fosfolipasi C. La regolazione dei canali ionici da parte delle proteine G è illustrata nel Capitolo 22.

Il sistema dell'adenilato ciclasi

L'adenilato ciclasi è regolata da diverse subunità delle proteine G

L'adenilato ciclasi è un enzima ubiquitario che converte ATP in AMP ciclico (cAMP). L'attività dell'adenilato ciclasi è regolata da numerosi neurotrasmettitori e ormoni che agiscono attraverso recettori accoppiati alle proteine G. Alcuni di questi recettori stimolano l'attività dell'enzima, mentre altri la inibiscono (Tabella 13.1). Esistono nove forme principali di adenilato ciclasi, denominate tipo 1-9, espresse diversamente nei vari tessuti. Tutti questi enzimi hanno una struttura complessiva simile in cui un breve segmento aminoterminale e due estese regioni citoplasmatiche (denominate C1 e C2) sono separati da due porzioni altamente idrofobiche della molecola (M1 e M2), ciascuna delle quali si ritiene attraversi sei volte la membrana plasmatica (Figura 13.3). I diversi tipi di adenilato ciclasi mostrano un'elevata omologia di sequenza in parte delle due regioni citoplasmatiche, che sono essenziali per l'attività catalitica, ma differiscono notevolmente nelle altre zone della molecola. Questa eterogeneità riflette l'esistenza di diversi meccanismi di regolazione dell'adenilato ciclasi dipendenti dallo specifico tipo di enzima coinvolto.

L'attivazione della proteina G_s da parte di un vasto gruppo di recettori rappresenta il principale meccanismo di stimolazione dell'adenilato ciclasi. La subunità α_s -GTP è infatti in grado di interagire direttamente con il dominio C2 e l'estremità aminoterminale del dominio C1 di tutte le forme di adenilato ciclasi stimolandone l'attività (Figura 13.3). Recettori accoppiati con proteine della classe G_i

possono invece ridurre l'attività dell'enzima attraverso le subunità α_i , che inibiscono alcuni tipi di adenilato ciclasi (Figura 13.3). Le subunità α_i attivate si legano al dominio C1 della molecola enzimatica e interferiscono con la modificazione conformazionale indotta da α_s . Forme specifiche di adenilato ciclasi vengono inoltre stimolate o inibite dai complessi $\beta\gamma$ delle proteine G.

Il cAMP regola l'attività delle proteinchinasi A

L'attività dell'adenilato ciclasi, dinamicamente controllata da ormoni e neurotrasmettitori, è la determinante più importante delle variazioni dei livelli intracellulari di cAMP. Il cAMP regola diverse proteine cellulari, e in particolare un tipo di proteinchinasi chiamata proteinchinasi cAMP-dipendente o proteinchinasi A (PKA). In assenza di cAMP, la PKA è formata da due subunità regolatorie e da due subunità catalitiche unite a formare un complesso tetramericamente inattivo; all'aumentare della concentrazione intracellulare di cAMP, questo si lega alle subunità regolatorie e ne causa il distacco da quelle catalitiche; le subunità catalitiche sono a questo punto libere di fosforilare in serina o treonina proteine specifiche, regolandone così l'attività (vedi Capitolo 9). Il cAMP prodotto in seguito alla stimolazione dell'adenilato ciclasi viene poi rapidamente distrutto dalla cellula grazie all'azione di una famiglia di enzimi, le fosfodiesterasi, che lo idrolizzano a 5'-AMP (Figura 13.3) (su questi enzimi come bersaglio di farmaci, vedi CD: Approfondimento 13.4. *Farmaci attivi sulle fosfodiesterasi*). Anche gli effetti dell'attivazione della PKA sono generalmente transitori in quanto nelle cellule sono presenti delle fosfatasi per fosfoproteine che contrastano l'attività della chinasi.

L'attivazione della PKA da parte del cAMP controlla svariate funzioni cellulari, quali l'attività di canali ionici, reazioni metaboliche, la trascrizione di geni specifici, l'attività cardiaca, il rilasciamento delle cellule muscolari lisce, la secrezione, il differenziamento e la proliferazione. I substrati che vengono fosforilati dalla PKA, e quindi la risposta cellulare che viene indotta, dipendono dalla localizzazione dell'enzima nella cellula. Questa, a sua

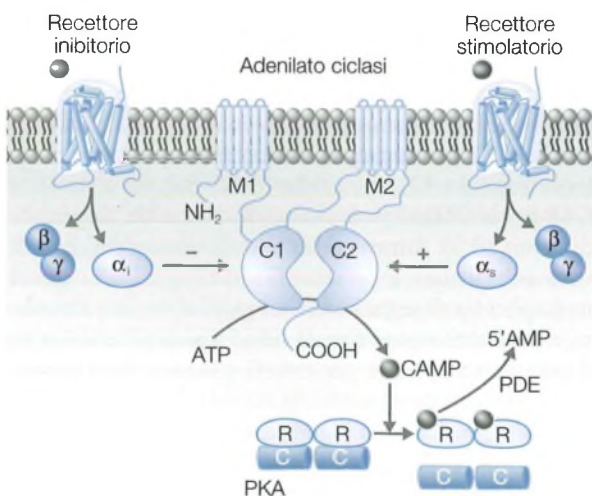


FIGURA 13.3 Sistema dell'adenilato ciclasi. Sono rappresentati la struttura dell'enzima e i principali meccanismi della sua regolazione da parte di recettori di tipo stimolatorio e inibitorio. Agonisti o antagonisti di molti recettori stimolatori, quali i recettori adrenergici β , o inibitori, come i recettori adrenergici α_2 e dopaminergici D_2 , sono largamente usati come farmaci. Stimolazione e inibizione dell'adenilato ciclasi sono mediate dalle subunità α_s -GTP e α_i -GTP, rispettivamente. Le subunità delle proteine G sono rappresentate nel citoplasma solo per chiarezza del disegno e la loro posizione rispetto alla molecola dell'adenilato ciclasi è arbitraria. La stimolazione dell'adenilato ciclasi porta ad aumento della concentrazione intracellulare di cAMP e a conseguente attivazione della proteinchinasi A (PKA). Nella sua forma inattiva la PKA è costituita da due subunità regolatorie (R) unite a due subunità catalitiche (C). Il legame del cAMP provoca il rilascio delle subunità catalitiche che fosforilano vari substrati cellulari. Il cAMP viene infine idrolizzato dalle fosfodiesterasi (PDE).

volta, è determinata dall'interazione della PKA con i vari membri della famiglia delle proteine AKAP (*A-Kinase Anchoring Protein*), che si legano alle subunità regolatorie del tetramero inattivo. Esistono più di 50 diverse proteine AKAP che localizzano la PKA in specifiche regioni cellulari nei vari tipi di cellule. Le AKAP sono proteine che possiedono molteplici domini in grado di legare altre proteine e promuovono così l'assemblaggio di complessi multimolecolari. Questi complessi possono contenere varie componenti della via di segnalazione cAMP-PKA quali recettori, forme di adenilato ciclasi, substrati specifici della PKA, fosfodiesterasi e fosfatasi. Ponendo in stretta vicinanza queste molecole, le proteine AKAP controllano quindi non solamente la localizzazione cellulare ma anche l'entità e le caratteristiche temporali dei segnali mediati dalla PKA.

È infine importante ricordare che, nonostante nella maggior parte dei casi il cAMP agisca attraverso la PKA, questo nucleotide può svolgere il suo ruolo di secondo messaggero anche attraverso altri meccanismi. Ad esempio, in alcuni sistemi il cAMP si lega direttamente a canali cationici di membrana attivandoli e inducendo così un afflusso di Na^+ , K^+ e Ca^{2+} nella cellula. Il canale f nel nodo senoatriale cardiaco è uno degli esempi più importanti di questo tipo di regolazione. Il canale f aperto

dal cAMP, a sua volta prodotto dalla stimolazione dei recettori adrenergici β da parte della noradrenalina, dà origine alla corrente depolarizzante *If* che è fondamentale per l'attività pacemaker e quindi per la regolazione della frequenza cardiaca. Livabradina è un farmaco dotato di specifica attività bloccante l'*If* e quindi dotato di attività bradicardizzante.

L'idrolisi dei fosfoinositidi

La fosfolipasi C idrolizza il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato e dà origine a due secondi messaggeri

L'attivazione di una particolare fosfodiesterasi, la fosfolipasi C, da parte di neurotrasmettitori, ormoni, fattori di crescita e altri mediatori chimici induce l'idrolisi di uno specifico fosfolipide di membrana, il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP_2). Il PIP_2 , che si trova localizzato nel foglietto interno della membrana plasmatica, deriva dal fosfatidilinositolo in seguito a due successive fosforilazioni, nelle posizioni 4 e 5 dell'anello della molecola, a opera di specifiche chinasi (Figura 13.4). L'acido stearico e l'acido arachidonico sono gli acidi grassi che occupano rispettivamente la posizione 1 e

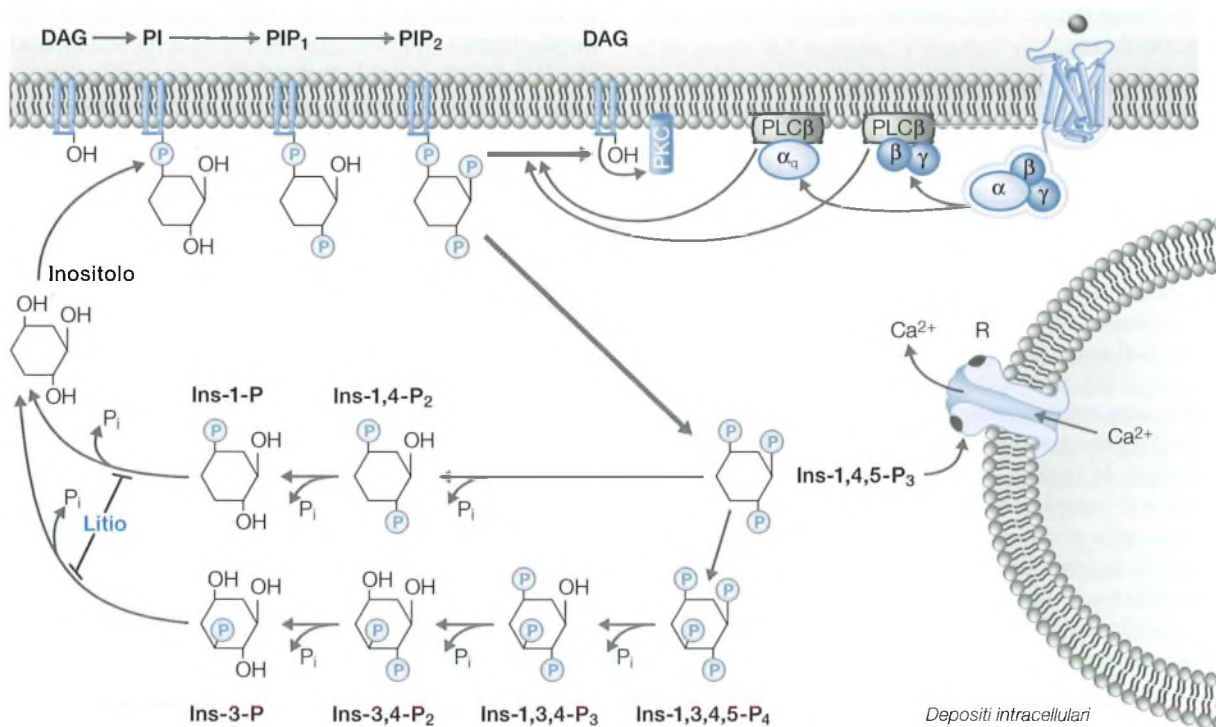


FIGURA 13.4 Idrolisi dei fosfoinositidi. È rappresentata la via di sintesi dei fosfoinositidi che porta, a partire da inositolo e diacilglicerolo (DAG), alla formazione di fosfatidilinositolo (PI), fosfatidilinositolo 4-fosfato (PIP₁) e fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP₂). La fosfolipasi C (PLC) idrolizza il PIP₂ generando DAG e inositolo 1,4,5-trisfosfato (Ins-1,4,5-P₃): il primo determina attivazione della proteinchinasi C (PKC) mentre il secondo, interagendo con un suo recettore specifico (R), induce liberazione di Ca²⁺ da depositi intracellulari a rapido scambio. I recettori a sette domini transmembrana attivano, attraverso le subunità delle proteine G, le fosfolipasi C di tipo β. Tutte le fosfolipasi C-β sono effettori delle subunità α_q. Alcuni di questi enzimi, come la fosfolipasi C-β₂, sono anche stimolati dal complesso βγ. La figura illustra anche le principali vie metaboliche dell'Ins-1,4,5-P₃, attraverso cui si riforma inositolo, e i siti d'azione del litio.

2 nella struttura del glicerolo che forma il fosfolipide. Lidrolisi del PIP_2 a opera della fosfolipasi C dà origine ai due secondi messaggeri InsP_3 e DAG. Queste due vie di segnalazione sono di importanza fondamentale in quanto regolano un grande numero di processi cellulari, quali il metabolismo, la secrezione, la contrazione delle cellule muscolari, l'attività neuronale, la migrazione e la proliferazione cellulare.

Esistono 13 isoforme di fosfolipasi C che sulla base delle loro caratteristiche strutturali, sono state suddivise in sei classi: β , γ , δ , ϵ , ζ e η . Le varie isoforme vengono indicate con numeri dopo le lettere greche (ad esempio, $\beta 1$ o $\gamma 2$). I diversi tipi di fosfolipasi C differiscono sia per peso molecolare sia per sequenza amminoacidica. Tutte possiedono due regioni, denominate X e Y, che dimostrano una certa omologia di sequenza e rappresentano i siti catalitici. Nelle altre regioni della molecola, i diversi tipi di enzima contengono sequenze regolatorie diverse che ne permettono l'attivazione da parte di molecole specifiche. Le varie sottofamiglie di fosfolipasi C differiscono infatti notevolmente, come illustrato di seguito, nei loro meccanismi di regolazione. I diversi isoenzimi sono inoltre espressi diversamente nei vari tipi di cellule. L'attività catalitica di tutte le fosfolipasi C in sistemi in vitro è Ca^{2+} -dipendente. Lidrolisi è specifica per i fosfolipidi contenenti inositolo: il PIP_2 è il substrato preferito, seguito dal fosfatidilinositolo 4-fosfato e dal fosfatidilinositolo. In genere, la localizzazione dell'enzima è citoplasmatica e l'attivazione induce il suo trasferimento, o "traslocazione" alla membrana.

Diversi meccanismi di attivazione delle fosfolipasi C

Le fosfolipasi C possono essere attivate attraverso molteplici meccanismi. Tra questi, i meglio caratterizzati sono quelli che interessano le fosfolipasi C di tipo β e le fosfolipasi C di tipo γ . Le fosfolipasi C di tipo β di cui si conoscono quattro isoforme, sono effettori di diverse subunità delle proteine G (Figura 13.4). Tutte le fosfolipasi C- β sono attivate dalle subunità α delle proteine G di tipo Gq. Alcuni enzimi, in particolare la fosfolipasi C- $\beta 2$, sono anche attivati dal complesso $\beta\gamma$ delle proteine G. Nel legame tra le fosfolipasi C- β e la subunità α_q sono coinvolte le regioni carbossiterminali dei vari enzimi, mentre il complesso $\beta\gamma$ interagisce con una sequenza situata nella porzione aminoterminale della fosfolipasi C- $\beta 2$. Il legame con le subunità α_q o il complesso $\beta\gamma$, entrambi associati alla membrana, comporta la traslocazione della fosfolipasi C- β dal citoplasma. Il meccanismo di attivazione delle due forme di fosfolipasi C di tipo γ è invece tipico dei recettori per i fattori di crescita (vedi Capitolo 14). In seguito al legame con il fattore di crescita questi recettori attivano la loro attività tirosinchinasica intrinseca e si autofosforilano. Le sequenze fosforilate del recettore interagiscono poi con uno dei domini SH2 situati tra le regioni X e Y della fosfolipasi C- γ . L'enzima si associa quindi al recettore, traslocando dal citoplasma alla membrana, e viene a sua volta fosforilato in tirosina e, in questo modo, attivato. Anche altri recettori, come i

recettori per gli antigeni e le immunoglobuline o gli stessi recettori accoppiati alla proteina G, possono attivare le fosfolipasi C- γ . In questo caso, il recettore attiva tirosinchinasi cellulari che fosforilano l'enzima. I meccanismi coinvolti nell'attivazione delle altre classi di fosfolipasi C sono molteplici e, in parte, ancora poco chiari. Spesso, questi enzimi non sono attivati da recettori ma da molecole intracellulari che partecipano alla trasduzione del segnale, come il Ca^{2+} o GTPasi monomeriche.

Il diacilglicerolo attiva la proteinchinasi C e l'inositolo 1,4,5-trisfosfato mobilizza calcio dai depositi intracellulari

Il DAG derivato dall'idrolisi dei fosfoinositidi rimane confinato nella membrana plasmatica e qui attiva le proteinchinasi C (PKC) che, a loro volta, sono in grado di fosforilare in serina e treonina substrati specifici (Figura 13.4 e vedi Capitolo 9). Le PKC sono una famiglia che comprende numerosi enzimi, regolati attraverso meccanismi diversi e coinvolti in una grande varietà di funzioni cellulari. Sette forme di PKC vengono attivate dal DAG. Il legame del DAG determina la traslocazione della PKC dal citoplasma alla membrana plasmatica, dove l'enzima va incontro a una modificazione conformazionale che rende attiva la sua porzione catalitica. L'attivazione della PKC richiede l'interazione contemporanea con DAG e fosfolipidi ed è, in alcuni casi, anche dipendente dal Ca^{2+} . La formazione di DAG conseguente all'idrolisi dei fosfoinositidi è transiente. Il DAG viene infatti rapidamente metabolizzato o da una lipasi specifica o da una chinasi che lo converte in acido fosfatidico.

L' InsP_3 è l'altro secondo messaggero derivato dall'idrolisi del PIP_2 . Essendo idrofilo, esso diffonde nel citoplasma dove si lega a specifici recettori posti su strutture vescicolari associate al reticolo endoplasmatico che svolgono il ruolo di depositi di Ca^{2+} a rapido scambio (vedi Capitolo 10). Il recettore per l' InsP_3 è un canale che, una volta aperto in seguito al legame con il suo agonista, lascia fluire nel citoplasma il Ca^{2+} contenuto in questi organuli determinando così un aumento transitorio della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 13.4). L' InsP_3 prodotto in seguito all'attivazione della fosfolipasi C viene rapidamente metabolizzato nel citoplasma (Figura 13.4). Due sono gli enzimi coinvolti in questo processo di eliminazione. Una fosfatasi, che è specifica per la posizione 5 dell'inositolo ($\text{InsP}_3/\text{InsP}_4$ -5-fosfatasi) trasforma l' InsP_3 in inositolo 1,4-bisfosfato, mentre una chinasi, specifica per la posizione 3, produce inositolo 1,3,4,5-tetrakisfosfato (InsP_4). L' InsP_4 , che si ritiene possa svolgere nella cellula funzioni specifiche, viene poi trasformato in inositolo 1,3,4-trisfosfato dalla $\text{InsP}_3/\text{InsP}_4$ -5-fosfatasi. Per defosforilazioni successive a opera di specifiche fosfatasi, l'inositolo 1,4-bisfosfato e l'inositolo 1,3,4-trisfosfato vengono infine riconvertiti a inositolo libero che chiude il ciclo andando a risintetizzare i fosfolipidi precursori.

Il litio, usato per il trattamento del disturbo bipolare, inibisce una delle fosfatasi coinvolte nella degradazione degli inositoli fosfati, l'inositolo monofosfatasi, causando così l'accumulo di inositolo 1-fosfato e l'interruzione del ciclo di sintesi dei fosfolipidi di membrana che

sono substrato della reazione di idrolisi (Figura 13.4). Alcuni studi hanno dimostrato che questo comporta una diminuzione dei segnali dipendenti dalla fosfolipasi C e modificazioni dell'attività neuronale. Si ipotizza che l'inibizione dell'inositolo monofosfatasi contribuisca, almeno in parte, all'azione terapeutica del farmaco nel disturbo bipolare.

Interazione dei recettori accoppiati alle proteine G con altre proteine

Una grande varietà di proteine interagisce con i recettori accoppiati alle proteine G

È noto da tempo che i recettori a sette domini transmembrana interagiscono, con le loro porzioni citoplasmatiche, non solo con le proteine G ma anche con proteine coinvolte nella desensitizzazione. Un ruolo fondamentale in questo processo è svolto dal legame delle β -arrestine alla molecola recettoriale attivata e successivamente fosforilata dalle chinasi GRK (vedi Capitolo 6). Un numero sempre crescente di osservazioni sperimentali indica però che i recettori a sette domini transmembrana possono associarsi anche a molte altre proteine. Queste si legano, in genere, a sequenze che mediano interazioni proteina-proteina presenti nella terza ansa citoplasmatica e nella coda carbossiterminale del recettore. Molti recettori accoppiati alle proteine G contengono all'estremità carbossiterminale una breve sequenza che riconosce i domini PDZ presenti in diverse proteine cellulari. Brevi sequenze ricche in prolina presenti in diversi recettori possono invece mediare l'interazione con proteine che contengono domini SH3 o altri domini specifici (vedi Capitolo 14).

Molte proteine che interagiscono con i recettori a sette segmenti transmembrana sono espresse diversamente nei diversi sistemi cellulari. In alcuni casi, la proteina è costitutivamente associata al recettore mentre in altri casi si lega solamente in seguito all'attivazione della molecola recettoriale da parte del ligando. Frequentemente, le proteine che interagiscono con i recettori accoppiati alle proteine G possono legare, a loro volta, altre proteine e agire così come "piattaforme" che promuovono l'assemblaggio di complessi multimolecolari associati al recettore.

Proteine che interagiscono con i recettori accoppiati alle proteine G regolano il traffico intracellulare e la localizzazione del recettore

Le proteine che si associano ai recettori accoppiati alle proteine G svolgono una serie di importanti funzioni. In diversi casi, regolano il traffico intracellulare della molecola recettoriale. Alcune proteine agiscono come "chaperones" che guidano il trasporto dei recettori sintetizzati dalla cellula alla membrana plasmatica. Altre invece influenzano il destino dei recettori che, in seguito a stimolazione da parte del ligando, sono stati internalizzati mediante endocitosi. Questi recettori possono venire destinati ai lisosomi, dove vengono degradati, oppure essere nuovamente trasportati alla membrana plasmatica. Esistono

proteine che, se associate al recettore, ne promuovono la degradazione lisosomiale. Un esempio sono le proteine GASP che si associano ai recettori per gli oppioidi di tipo δ , ai recettori dopaminergici D_2 e ai recettori dei cannabinoidi nel sistema nervoso centrale. L'interazione di alcuni recettori con altre proteine sembra invece favorire il riciclo del recettore alla membrana plasmatica.

Un'altra funzione delle proteine che interagiscono con i recettori accoppiati alle proteine G è la localizzazione del recettore in regioni specializzate della membrana plasmatica. Un esempio ben caratterizzato è quello delle proteine Homer che si legano a una sequenza ricca in prolina dell'estremità carbossiterminale dei recettori metabotropici per il glutammato mGluR1 e mGluR5 espressi nel sistema nervoso centrale. Le proteine Homer sono in grado di interagire con una serie di altre proteine, che in alcuni casi sono a loro volta connesse al citoscheletro, e determinano la localizzazione dei recettori mGluR1 e mGluR5 in particolari aree della membrana postsinaptica delle spine dendritiche (vedi Capitolo 38).

Alcune proteine modulano le proprietà funzionali dei recettori

Le proteine che interagiscono con i recettori a sette domini transmembrana possono anche regolare la trasmissione del segnale attraverso le proteine G. In alcuni casi, aumentano l'efficienza della risposta mediata dalle proteine G perché legano molecole coinvolte nella trasmissione del segnale posizionandole in stretta vicinanza al recettore. Ad esempio, i recettori mGluR1 e mGluR5, che sono associati alle proteine Homer, determinano l'attivazione di G_q e la conseguente stimolazione della fosfolipasi C. Le proteine Homer sono in grado di legarsi a varie molecole coinvolte in questa via di segnalazione, tra cui il recettore per l'InsP₃ e il recettore per la rianodina, consentendo quindi che l'attivazione della fosfolipasi C da parte dei recettori avvenga in prossimità dei canali che mediano il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari (vedi Capitoli 10 e 38). Analogamente, l'interazione delle proteine AKAP, che legano la proteinchinasi A, con il recettore adrenergico β_2 , accoppiato a G_s , rende più efficiente l'attivazione della chinasi in seguito alla stimolazione recettoriale. In altri casi, le proteine che interagiscono con i recettori accoppiati alle proteine G possono invece ridurre l'efficienza con cui il recettore attiva determinate vie di trasmissione del segnale. Questo può avvenire attraverso un'inibizione della possibilità del recettore di interagire con le proteine G o il reclutamento di molecole che regolano negativamente la trasmissione del segnale. Ad esempio, le porzioni citoplasmatiche di diversi recettori sono in grado di legare, direttamente o attraverso un'altra proteina, le proteine RGS che accelerano l'attività GTPasica delle subunità α attivate. Attraverso queste diverse modalità, le proteine che interagiscono con i recettori a sette domini transmembrana hanno quindi un ruolo importante nel determinare, nella diverse cellule, gli aspetti temporali e l'intensità del segnale trasmesso da una determinata proteina G.

In genere, le proteine che si associano ai recettori a sette

domini transmembrana interagiscono con le porzioni intracellulari della molecola recettoriale e non modificano le proprietà farmacologiche dei recettori. Un'eccezione è rappresentata dalle proteine transmembrana RAMP (*Receptor Activity Modifying Proteins*) (Figura 13.5). Esistono tre diverse forme di queste proteine, RAMP1, RAMP2 e RAMP3. Le diverse proteine RAMP sono in grado di interagire con il recettore per la calcitonina e il recettore chiamato CRLR (*Calcitonin Receptor-Like Receptor*) e determinano la specificità dell'interazione della molecola recettoriale con il ligando. Nel caso di CRLR, quando il recettore è legato a RAMP1 riconosce un peptide simile alla calcitonina denominato CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*). L'associazione di CRLR a RAMP2 o RAMP3 porta invece alla formazione di due sottotipi diversi di recettore per un altro peptide, l'adrenomedullina.

I recettori a sette domini transmembrana attivano segnali indipendenti dalle proteine G attraverso il legame con le β -arrestine

Le ricerche degli ultimi anni hanno rivelato che i recettori a sette domini transmembrana non si limitano a trasmettere segnali attraverso il "classico" meccanismo che utilizza le proteine G. Alcune delle proteine che interagiscono con le porzioni citoplasmatiche di questi recettori portano infatti all'attivazione di specifiche vie di segnalazione intracellulare (Figura 13.5). I segnali indipendenti dalle proteine G attivati dai recet-

tori a sette domini transmembrana che sono stati meglio caratterizzati sono quelli mediati dalle β -arrestine. Queste proteine sono infatti molecole adattatrici multifunzionali coinvolte non solo nella desensibilizzazione del recettore ma anche nella trasmissione del segnale. È stato dimostrato che le β -arrestine legate al recettore possono stimolare le MAPK (vedi Capitoli 6 e 10; vedi CD: Approfondimento 6.2). In alcuni casi, questo avviene attraverso il legame alla chinasi Src, che viene così attivata, e il conseguente assemblaggio di un complesso multimolecolare che contiene il recettore, la β -arrestina, Src e diverse componenti della cascata delle MAPK. Attivano le MAPK con un meccanismo Src-dipendente i recettori adrenergici β_2 e i recettori NK1 per la sostanza P. In altri casi, come quello del recettore per l'angiotensina di tipo 1A, le β -arrestine portano alla stimolazione delle MAPK promuovendo la formazione di un complesso contenente il recettore, la β -arrestina, le chinasi Raf e MEK e le stesse MAPK. È ovvio domandarsi perché i recettori a sette domini transmembrana usino due diversi meccanismi, le proteine G e le β -arrestine, per attivare lo stesso segnale. Almeno in alcuni casi, si è visto che l'attivazione delle MAPK dipendente dalle β -arrestine avviene quando il recettore è localizzato negli endosomi e, rispetto a quella indotta dalle proteine G a livello della membrana plasmatica, ha caratteristiche spazio-temporali diverse e induce una risposta cellulare diversa. L'effetto delle proteine G è rapido e transiente e determina la traslocazione nucleare delle MAPK e la regolazione della

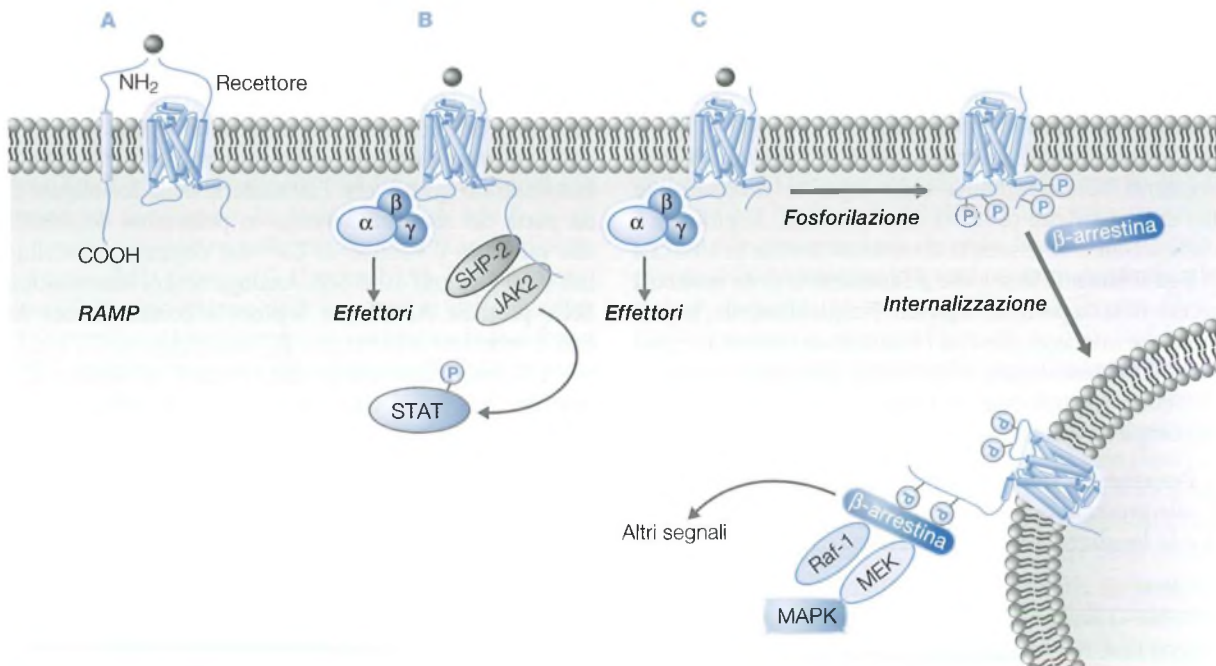


FIGURA 13.5 I recettori a sette domini transmembrana interagiscono con diverse proteine e attivano segnali indipendenti dalle proteine G. **A.** Interazione dei recettori per la calcitonina e del recettore chiamato CRLR (*Calcitonin Receptor-Like Receptor*) con le proteine RAMP. Queste proteine determinano la specificità del legame della molecola recettoriale con il ligando. **B.** Diverse proteine che interagiscono con le regioni intracellulari del recettore sono invece coinvolte nella trasmissione del segnale. Nel caso del recettore di tipo 1 per l'angiotensina II è stato dimostrato che la coda carbossiterminale della molecola interagisce con un complesso formato dalla fosfatasi SHP-2 e dalla tirosin-chinasi JAK2. Questo favorisce l'attivazione di JAK2 e la fosforilazione dei fattori di trascrizione STAT. **C.** Moltissimi recettori attivano le MAPK e altri segnali intracellulari attraverso le β -arrestine. Le β -arrestine si legano ai recettori attivati e fosforilati dalle chinasi GRK. L'attivazione delle MAPK avviene negli endosomi attraverso l'assemblaggio di un complesso che può contenere molecole diverse.

trascrizione genica. La stimolazione delle MAPK mediata dalle β -arrestine è invece più tardiva e più prolungata nel tempo ed è confinata al citoplasma. In questo modo i recettori possono quindi effettuare una regolazione estremamente sofisticata della cascata delle MAPK. Oltre a Src e alle MAPK, le β -arrestine sembrano in grado di regolare numerose altre molecole coinvolte nella segnalazione intracellulare come la chinasi AKT, che controlla la sopravvivenza cellulare, e diversi fattori nucleari di trascrizione, tra cui NF- κ b (vedi Capitolo 19).

Un aspetto molto interessante emerso dagli studi più recenti è che, mentre il mediatore chimico che si lega al proprio recettore attiva sia i segnali attivati dalle proteine G sia quelli mediati dalle β -arrestine, esistono degli agonisti che agiscono preferenzialmente o esclusivamente su l'una o l'altra via di segnalazione. Le attuali conoscenze su questi agenti sono ancora limitate. Tuttavia, questi agonisti "biased" possono potenzialmente fornire l'opportunità di un intervento farmacologico particolarmente selettivo.

■ Altri segnali indipendenti dalle proteine G

Oltre alle β -arrestine, altre proteine coinvolte nella trasmissione di segnali intracellulari interagiscono con i recettori a sette domini transmembrana. È stato dimostrato, ad esempio, che l'attivazione dei recettori di tipo 1 per l'angiotensina II provoca l'associazione di un complesso contenente la tirosinchinasi JAK2 alla coda carbossiterminale del recettore (Figura 13.5). In seguito a questa interazione, JAK2 viene attivata e può fosforilare i fattori di trascrizione STAT determinando così la loro traslocazione al nucleo e la regolazione dell'espressione di una serie di geni. I recettori adrenergici β_2 attivati interagiscono invece con la proteina denominata *Na²⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor 1* (NHERF1) che si lega attraverso un dominio PDZ all'estremità carbossiterminale

della molecola recettoriale. Questa interazione impedisce la capacità di NHERF1 di inibire l'attività dello scambiatore $\text{Na}^{2+}/\text{H}^+$. Il legame di NHERF rappresenta quindi una via indipendente dalle proteine G attraverso cui i recettori β_2 possono attivare lo scambiatore $\text{Na}^{2+}/\text{H}^+$ nelle cellule renali.

Negli ultimi anni le conoscenze sulle caratteristiche strutturali dei recettori a sette domini transmembrana e delle diverse subunità delle proteine G si sono considerevolmente ampliate. Inoltre, l'idea "classica" che un recettore a sette domini transmembrana trasmetta il segnale attraverso una determinata proteina G, a sua volta in grado di regolare effettori specifici, è stata sostituita da un'idea più complessa. Sappiamo oggi che i recettori possono essere associati tra loro a formare omodimeri, eterodimeri o strutture più complesse e che ogni catena recettoriale può attivare più di un tipo di proteina G. Sappiamo anche che i recettori a sette domini transmembrana non legano solo le proteine G ma anche altre proteine intracellulari che spesso agiscono come "piattaforme" per l'assemblaggio di complessi multimolecolari associati al recettore. Questi complessi possono regolare la funzione del recettore ma possono anche mediare segnali indipendenti dalle proteine G. L'insieme di queste conoscenze fornisce la possibilità di nuovi approcci farmacologici tra cui modulatori allosterici della funzione recettoriale, farmaci che hanno come bersaglio dimeri recettoriali o agonisti "selettivi" per l'attivazione di determinate proteine G o determinati segnali indipendenti dalle proteine G. Le ricerche future permetteranno sicuramente una comprensione più completa di come sia organizzata, strutturalmente e funzionalmente, la trasmissione del segnale attraverso i vari tipi di recettori accoppiati alle proteine G e forniranno ulteriori basi per lo sviluppo di farmaci che controllino la funzione di questa importante classe di molecole recettoriali.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I recettori accoppiati alle proteine G sono la famiglia più numerosa di recettori e mediano le risposte cellulari a moltissimi mediatori chimici, alla luce e agli stimoli olfattivi e gustativi.
- ▶ Tutti i recettori accoppiati alle proteine G sono costituiti da una catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica.
- ▶ Le proteine G sono eterotrimeri $\alpha\beta\gamma$ in grado di legare e idrolizzare il GTP. Quando vengono attivate dal recettore, le proteine G regolano la funzione di enzimi, canali ionici e altri effettori intracellulari.
- ▶ L'adenilato ciclasasi catalizza la formazione di cAMP che a sua volta attiva la proteinchinasi A.
- ▶ L'idrolisi dei polifosfoinositidi di membrana da parte della fosfolipasi C porta alla formazione di due secondi messaggeri: l'inositolo trifosfato e il diacilglicerolo.
- ▶ I recettori a sette domini transmembrana interagiscono con diverse proteine intracellulari e possono attivare segnali indipendenti dalle proteine G.

Bibliografia essenziale

- ▶ Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:145-74.
- ▶ Luttrell LM, Gesty-Palmer D. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signalling. *Pharmacol Rev* 2010;62:305-30.
- ▶ Lohse MJ. Dimerization in GPCR mobility and signalling. *Current Opin Pharmacol* 2010;10:53-8.
- ▶ Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science* 2002;296:1636-9.
- ▶ Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G protein-coupled receptors. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2008;9:60-71.
- ▶ Ritter SL, Hall RA. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2009;10:819-30.
- ▶ Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G protein-coupled receptors. *Nature* 2009;459:356-63.
- ▶ Suh PG, Park JI, Manzoli L et al. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep* 2008;41:415-34.

I recettori per i fattori di crescita

Silvia Giordano, Carla Boccaccio, Paolo M. Comoglio

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le basi teoriche per comprendere i meccanismi molecolari d'azione dei recettori per i fattori di crescita
- ▶ Acquisire nozioni sui meccanismi che permettono a questi recettori di promuovere e sostenere la crescita e la progressione tumorale
- ▶ Acquisire i concetti base circa le terapie molecolari attualmente utilizzate per inibire questi recettori e le nozioni generali sulle tipologie di molecole utilizzate

■ I fattori di crescita modulano le attività cellulari

La comunicazione fra le cellule è cruciale per lo sviluppo e la sopravvivenza degli organismi superiori. Negli ultimi cinquant'anni sono stati scoperti numerosi polipeptidi, chiamati genericamente *fattori di crescita*, che vengono liberati nell'ambiente extracellulare e sono capaci di stimolare la proliferazione. I fattori di crescita propriamente detti controllano l'ingresso e la progressione delle cellule nel ciclo duplicativo. Vengono distinti in *fattori di competenza* e *fattori di progressione*. I primi reclutano le cellule quiescenti nel ciclo cellulare; i secondi sono indispensabili per la transizione dalla fase G₁ alla fase S. La nomenclatura convenzionale assegna ai fattori di crescita specificità equivocate, attribuite prevalentemente per ragioni storiche. Ad esempio, l'EGF (fattore di crescita epidermico) agisce anche sui fibroblasti e sulle cellule della glia. L'HGF (fattore di crescita epatocitario) è mitogeno non solo per la maggior parte delle cellule epiteliali ma anche per gli endoteli vasali e per i mioblasti. L'NGF (fattore di crescita nervoso) agisce sui cheratinociti e sui linfociti, oltre che sulle cellule dei gangli simpatici. Inoltre, la funzione dei fattori di crescita non è limitata al controllo del ciclo cellulare, ma può estendersi al controllo di processi differenziativi, al controllo della sopravvivenza, della motilità e di alcune funzioni metaboliche.

L'attività biologica dei fattori di crescita è mediata da recettori proteici a elevata affinità localizzati nella membrana plasmatica. La maggioranza di questi recettori è dotata di attività enzimatica: sono tirosina chinasi, cioè enzimi capaci di catalizzare il trasferimento di gruppi fosfato dall'ATP a substrati proteici su residui di tirosina.

L'attività enzimatica è strettamente regolata: in assenza del ligando è inibita mentre il legame del fattore di crescita alla parte extracellulare del recettore rimuove questa inibizione; a sua volta, l'attività chinasi innesca una cascata di reazioni biochimiche all'interno della cellula che si traducono in risposte funzionali immediate e transitorie, o ritardate e durevoli. Le fasi precoci del processo di conversione del segnale extracellulare in risposta intracellulare vengono definite con il termine di *trasduzione del segnale*.

La fisiologia e la patologia dei recettori per i fattori di crescita e delle altre molecole coinvolte nella trasduzione intracellulare del segnale sono di grande interesse farmacologico per il loro coinvolgimento nella patogenesi delle neoplasie e di alcuni difetti metabolici. I fattori di crescita, i loro recettori e i trasduttori del segnale sono codificati dai cosiddetti *proto-oncogeni cellulari*. Questi geni (almeno un centinaio nel genoma umano), in condizioni fisiologiche, sono deputati al controllo della proliferazione; le loro controparti mutate o espresse in forma aberrante (*oncogeni*) sono capaci di indurre trasformazione neoplastica in sistemi sperimentali e sono associati all'insorgenza dei tumori umani. Un recettore con una mutazione nella sequenza amminoacidica che ne aumenti l'attività tirosina chinasi, ovvero prodotto in quantità eccessiva, trasmette il segnale proliferativo in modo deregolato (*attivazione costitutiva*). Al contrario, una diminuzione dell'attività del recettore è talvolta la base molecolare di un difetto morfogenetico o di un disturbo metabolico: un esempio è rappresentato dalle alterazioni del recettore dell'insulina, coinvolte nella patogenesi del diabete insulino-resistente.

Organizzazione molecolare dei recettori per i fattori di crescita

I recettori per i fattori di crescita sono tirosina chinasi a struttura modulare

I recettori per fattori di crescita propriamente detti (Tabella 14.1) costituiscono una famiglia di proteine che condivide una comune struttura di base: presentano una porzione N-terminale extracellulare, una singola regione idrofobica che attraversa la membrana plasmatica e un dominio citoplasmatico, sede dell'attività regolatoria e catalitica tirosinica. La maggior parte dei recettori noti è costituita da una singola catena polipeptidica. Fanno eccezione il recettore dell'insulina (tetrameric) e quello dell'HGF (dimerico) e i loro omologhi (Figura 14.1). In maniera schematica, i recettori sono articolati in cinque domini funzionali.

1. Il dominio extracellulare comprende il sito di legame a elevata affinità per il fattore di crescita. È formato da alcune centinaia di amminoacidi, contiene numerosi siti di glicosilazione, residui di cisteina (responsabili del folding proteico) e motivi strutturali peculiari che variano da recettore a recettore.

2. Il dominio transmembrana è costituito da circa 25 residui idrofobici che attraversano il doppio strato lipidico; questo dominio è in genere seguito – nella porzione intracellulare – da una serie di residui basici che fungono da segnale di ancoraggio alla membrana.
3. Il dominio iuxta-membrana, nella parte citoplasmatica, comprende una cinquantina di amminoacidi ed è sede di importanti funzioni regolatorie.
4. Il dominio catalitico, responsabile dell'attività chinasi, è formato da circa 250 amminoacidi ed è in alcuni casi interrotto da una regione a funzione regolatoria.
5. La coda C-terminale contiene in media 250 amminoacidi e ha lunghezza e funzioni variabili nei vari recettori: è il segmento che, nel recettore attivato, lega i trasduttori intracellulari del segnale.

I recettori ad attività tirosinica condividono una notevole omologia nelle regioni del dominio transmembrana e del dominio catalitico. I domini extracellulari sono invece molto variabili e presentano diverse combinazioni di motivi strutturali. Sulla base di queste differenze, i recettori possono essere raggruppati in almeno 15 sottofamiglie, i cui membri presentano sovrapponibili composizioni di motivi strutturali extracellulari (Figura

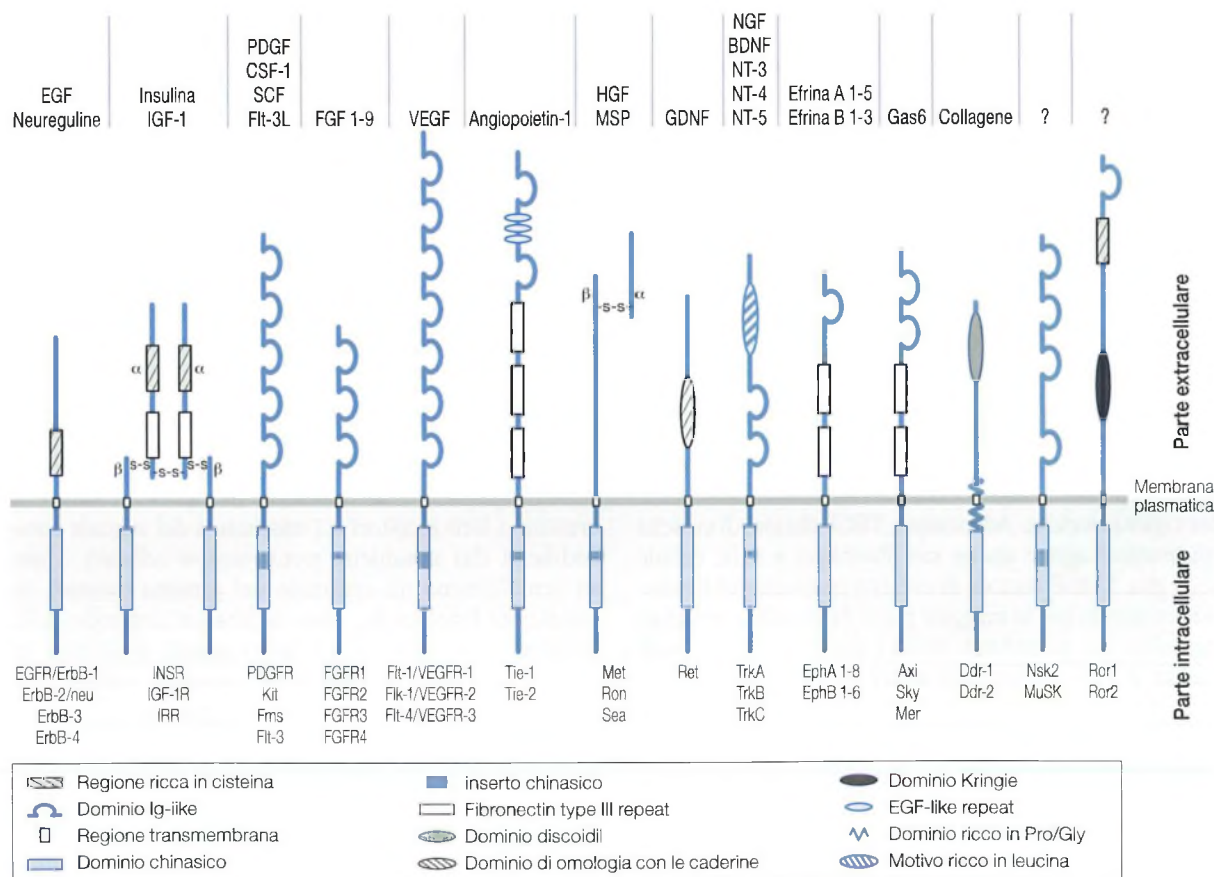


FIGURA 14.1 I recettori ad attività tirosin-chinasica sono classificati in sottofamiglie sulla base delle caratteristiche strutturali del dominio extracellulare e contengono diverse combinazioni di motivi proteici. Sono indicati i membri rappresentativi di ciascuna famiglia (in prossimità del dominio intracellulare) insieme ai ligandi corrispondenti (in prossimità del dominio extracellulare). Gli acronimi in maiuscolo sono esplicitati per esteso nella tabella 14.1.

14.1). Le funzioni di tali motivi sono di duplice natura. Alcuni concorrono alla formazione di complesse configurazioni tridimensionali che garantiscono stabilità e specificità al sito di legame per i fattori di crescita. Altri mediano la dimerizzazione dei recettori, evento critico per la trasduzione del segnale all'interno della cellula. A una

sottofamiglia di recettori corrisponde spesso una famiglia di fattori. Di regola ciascun tipo di recettore lega con elevata affinità un singolo fattore, ma sono note eccezioni: è possibile che un recettore leghi più fattori strutturalmente simili e che lo stesso fattore si leghi a diversi membri di una stessa sottofamiglia di recettori (Tabella 14.1).

TABELLA 14.1 Caratteristiche e attività biologiche di fattori di crescita che legano recettori ad attività tirosinchinasi

Fattore di crescita	Struttura	Attività	Recettore/i
EGF (fattore di crescita dell'epidermide)	Proteina di 6 kDa solubile derivante da taglio proteolitico di un precursore transmembrana attivo	Mitogenico per cellule epiteliali	EGFR (ErbB-1)
TGF- α (fattore di crescita trasformante)	Proteina di 6 kDa solubile derivante da taglio proteolitico di un precursore di 25 kDa palmitato	Mitogenico per cellule epiteliali	EGFR (ErbB-1)
Amfirogulina	Glicoproteina di 14-22 kDa	Mitogenica	EGFR (ErbB-1)
HB-EGF (EGF legante l'eparina)	Proteine solubili di 14-20 kDa derivanti da taglio proteolitico di un precursore transmembrana	Mitogenico, chemiotattico	EGFR/ErbB-4
Betacellulina	Glicoproteina solubile di 32 kDa derivante da taglio proteolitico di un precursore associato alla membrana	Mitogenico per cellule pancreatiche e mammarie	EGFR/ErbB-4
Nrg (Neureguline)-1e-2	Il gene NRG 1 codifica almeno 12 isoforme derivanti da <i>splicing alternativo</i> ; i fattori maturi sono glicoproteine di 42-59 kDa derivanti da taglio proteolitico di precursori associati alla membrana	Morfogenesi delle ghiandole mammarie, sviluppo di cuore, glia e sistema nervoso	ErbB-3/ErbB-4
IGF-1 (fattore di crescita simile all'insulina), insulina	Peptidi di 7,5 kDa secreti in forma monocatenaria	Proliferazione, differenziamento e sopravvivenza cellulare	InsR/IGF-1R
PDGF-AA, -AB, -BB (fattore di crescita derivato dalle piastrine)	Omo/eterodimeri di 30 kDa legati da ponti disolfuro formati da catene A (16-18 kDa) e/o B (12 kDa)	Chemiotassi, mitogenesi	PDGFR α / PDGFR β
SCF (fattore di crescita per le cellule staminali)	Glicoproteina di 31-36 kDa. Precursore transmembrana tagliato proteoliticamente in forme solubili	Proliferazione, differenziamento, migrazione e sopravvivenza di cellule ematopoietiche, melanociti e gameti	Kit
CSF-1 (fattore stimolante le colonie macrofagiche)	Glicoproteina omodimerica di 70-90 kDa. Forma transmembrana tagliata proteoliticamente in forme solubili	Proliferazione di linee monocito-macrofagiche. Impianto dell'embrione	Fms
Fit-3L	Eterodimero di 30 kDa legato da ponti disolfuro	Proliferazione, sopravvivenza di cellule progenitrici nel sistema ematopoietico	Flt-3
FGF 1-9 (fattore di crescita dei fibroblasti)	Glicoproteine monocatenarie di 17-30 kDa. Solubili, associate ai proteoglicani	Mitogenico, neurotrofico, angiogenico	FGFR1-4
VEGF A-B-C (fattore di crescita vasculo-endoteliale)	Glicoproteine omo/eterodimeriche di 35-45 kDa	Mitogenico e morfogenico per cellule endoteliali	VEGFR1-3
Angiopietina	Glicoproteina di 70 kDa	Assemblaggio di componenti non endoteliali della parete dei vasi	Tie-2
HGF (fattore di crescita degli epatociti)	Secreta come precursore inattivo a catena singola, trasformato per taglio proteolitico in eterodimero (30+60 kDa) unito da ponti disolfuro	Mitogeno, motogeno e morfogeno per cellule epiteliali, endoteliali e mesenchimali	Met
MSP (proteina stimolante i macrofagi)	Secreta come precursore inattivo a catena singola, trasformato per taglio proteolitico in eterodimero (25+45 kDa) unito da ponti disolfuro	Mitogeno, motogeno e morfogeno per cellule epiteliali, endoteliali e mesenchimali	Ron
GDNF (fattore neurotrofico derivato dalla glia)	Omodimero di 20 kDa con legami disolfuro	Fattore di sopravvivenza per cellule epiteliali e neuronali	complesso GDNFR/Ret
NGF (fattore di crescita nervoso), BDNF, NT3, NT4, NT5	Omodimeri di 15-25 kDa derivati da precursori inattivi	Fattori mitogeni, differenziati e di sopravvivenza per neuroni	Trk A-B-C
Efrina A1-5	Proteine di 21-28 kDa in forma solubile e GPI-associata	Fattori di differenziamento del sistema nervoso	Eph A1-8
Efrina B1-3	Proteine transmembrana di 34 kDa	Fattori di differenziamento del sistema nervoso	Eph B1-6
Gas6	Proteina secreta di 75 kDa	Fattore mitogenico e di sopravvivenza per cellule ematopoietiche e nervose	Axl/Sky

I domini trans- e iuxta-membrana modulano l'attività dei recettori per i fattori di crescita

La regione del recettore che attraversa il doppio strato lipidico della membrana plasmatica, costituita da circa 24 amminoacidi idrofobici, funge da connessione fra il dominio extra- e quello intra-cellulare. La ricezione e la trasduzione intracellulare del segnale dipendono dalla natura di questi ultimi, mentre il dominio transmembrana sembra avere solo un ruolo strutturale. Tuttavia, è stato dimostrato che una singola mutazione puntiforme nel segmento idrofobico transmembrana è sufficiente ad alterare drammaticamente l'attività tirosina chinasi del recettore, come nel caso del recettore codificato dall'oncogene *ERB-B2/neu*. La sua forma attivata, dotata di attività trasformante, differisce dalla controparte normale soltanto per un residuo di glutammato al posto di una valina nel dominio transmembrana.

La regione iuxtamembrana, cioè la sequenza di amminoacidi che separa il dominio transmembrana da quello catalitico, è molto ben conservata fra i recettori appartenenti a una stessa sottofamiglia. Questa regione è coinvolta nella modulazione della trasduzione del segnale da parte di stimoli estrinseci al recettore, un processo detto *transmodulazione*. È stato dimostrato che nei recettori dell'*EGF* e dell'*HGF* questa zona contiene residui di treonina o di serina la cui fosforilazione spegne l'attività catalitica dell'adiacente dominio chinasi. La fosforilazione del dominio iuxta-membrana è catalizzata principalmente dalla protein-chinasi C che è attivata dal diacilglicerolo e da ioni Ca^{2+} . La concentrazione di queste molecole è spesso aumentata dalla stimolazione della maggior parte dei recettori per fattori di crescita. In questo modo la stessa attivazione del recettore innesca meccanismi di regolazione retrograda negativa.

Il dominio catalitico è responsabile della trasduzione del segnale

A differenza del dominio extracellulare, il dominio intracellulare dei recettori per i fattori di crescita presenta un'omologia molto elevata fra tutti i recettori, giungendo fino al 90% fra i membri di una stessa sottofamiglia. L'omologia si concentra nel dominio catalitico tirosina chinasi, che comprende circa 250 amminoacidi ed è preceduto, seguito e talvolta interrotto da sequenze a funzione regolatoria.

La risoluzione della struttura cristallina di frammenti del recettore dell'insulina e dell'*FGF* ha permesso la costruzione di modelli per la struttura generale dei domini catalitici.

La figura 14.2 mostra due lobi delimitanti un recesso, nel quale ha luogo la reazione di trasferimento del gruppo fosfato dal complesso ATP-Mg al substrato proteico.

Dall'esame comparativo delle sequenze delle tirosina chinasi note risulta che vi sono 13 residui amminoacidici conservati in posizioni corrispondenti in tutti i recettori. Questi residui sono essenziali per la funzione catalitica e le interazioni con i substrati. La loro mutazione può alterare in senso positivo o negativo la funzione chinasi.

Il lobo N-terminale contiene un motivo ricco in glicina (Gly-X-Gly-X-Gly) e un residuo di lisina critici per il legame dell'ATP. È stato dimostrato che la mutazione di questa lisina inibisce completamente la funzione chinasi. Il lobo C-terminale contiene il *loop catalitico*, caratterizzato in tutti i recettori dalla sequenza His-Arg-Asp-Leu-Ala-Ala-Arg-Asn. L'aspartato costituisce la base catalitica, mentre gli amminoacidi che seguono permettono l'accesso e il riconoscimento del substrato. La regione del lobo C-terminale tra l'aspartato 1222 e il glutammato 1253 contiene il *loop di attivazione chinasi*. Nella maggior parte dei recettori questo comprende da una a tre tirosine conservate (1234-1235) dotate di funzione regolatoria. Mutazioni puntiformi trovate nei recettori codificati dagli oncogeni *MET*, *RET* e *KIT*, responsabili di tumori ereditari e non, interessano per lo più gli amminoacidi presenti nel loop di attivazione. Tali mutazioni stimolano l'attività chinasi anche in assenza del ligando.

Attivazione e trasduzione del segnale dei recettori per i fattori di crescita

I recettori si attivano per dimerizzazione

Il legame del recettore con il fattore di crescita induce l'attivazione della tirosina chinasi citoplasmatica attraverso

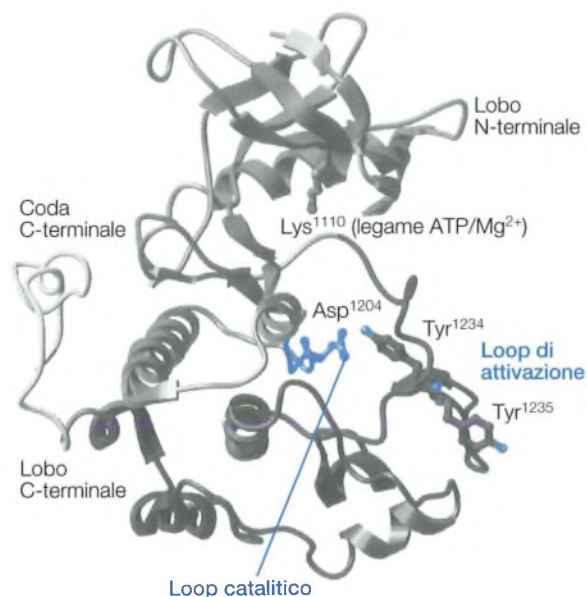


FIGURA 14.2 Struttura tridimensionale del dominio catalitico dei recettori per i fattori di crescita tirosin-chinasi. Il programma Modeler™ è stato utilizzato per costruire un modello ipotetico sulla base della struttura cristallina del recettore dell'insulina e dell'analisi comparativa delle sequenze dei recettori noti. Sono indicati gli amminoacidi conservati, critici per la funzione enzimatica. I loro numeri si riferiscono alla sequenza del recettore dell'*HGF* umano. I lobi N- e C-terminali del dominio catalitico delimitano una tasca in cui i due substrati, l'ATP (legato dalla Lys¹¹¹⁰) e il residuo di tirosina interagiscono tra loro. Le tirosine presenti nel loop di attivazione (Y¹²³⁴, Y¹²³⁵), trans/autofosforilate dopo stimolazione del recettore da parte del ligando, aumentano la V_{max} della chinasi per i substrati esogeni. (Per gentile concessione della Dr. L. Pugliese)

so un meccanismo basato sulla dimerizzazione (Figura 14.3). Le molecole recettoriali, in prevalenza monocatenarie, sono libere di muoversi nel doppio strato lipidico fluido della membrana plasmatica e quindi possono formare dimeri e oligomeri reversibili. Questo processo avviene spontaneamente, anche in assenza di fattori di crescita, a seguito delle interazioni multiple casuali tra recettori adiacenti. Anche i fattori di crescita sono prevalentemente monocatenari e legano una sola molecola di recettore. Tuttavia, il loro legame con il recettore induce un cambiamento conformazionale del dominio extracellulare che stabilizza le interazioni recettore-recettore e sposta l'equilibrio tra strutture monomeriche e oligomeriche a favore di queste ultime. Nel caso della sottofamiglia del recettore dell'insulina, l'unità recettoriale stessa si presenta sotto forma di dimero covalente anche in assenza di ligando. Nel caso del recettore del PDGF, il fattore è bidentato e stabilizza i dimeri legandosi a ponte fra due molecole adiacenti. In alcuni casi, la formazione di dimeri richiede interazioni complesse con altre molecole associate alla membrana. Ad esempio, FGF-1 e -2 inducono la dimerizzazione del recettore solo in presenza di proteoglicani eparan-solfati.

La dimerizzazione stabilizza lo stato attivo della chinasi e porta in sua prossimità il suo substrato preferito: il dominio intracellulare di un altro recettore. In questo modo si verifica la *transfosforilazione* dei recettori a livello di residui di tirosina situati sia all'interno che all'esterno del dominio catalitico.

La cristallografia ai raggi X ha dimostrato che, nel recettore dell'insulina, uno dei residui di tirosina conservati nel loop di attivazione del dominio catalitico esercita una funzione regolatoria. In assenza di ligando, questa tirosina impedisce che substrati proteici esogeni accedano al sito catalitico. L'ingombro sterico ne inibisce l'autofosforilazione in *cis*. In presenza di ligando, a seguito della dimerizzazione del recettore, questa tirosina viene transfosforilata e l'equilibrio si sposta verso una

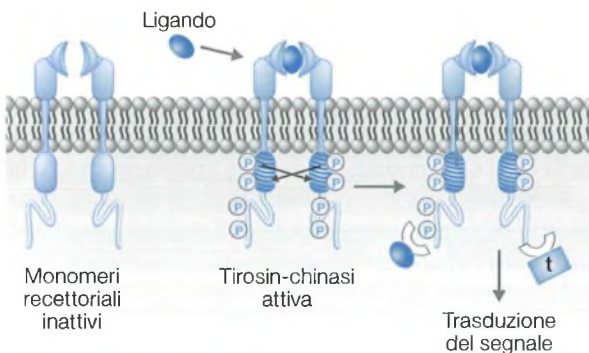


FIGURA 14.3 Modello dell'attivazione dei recettori tirosin-chinasi. Il legame reversibile del ligando al dominio extracellulare induce la dimerizzazione dei recettori e modificazioni allosteriche responsabili dell'attivazione enzimatica. Si verifica la reciproca fosforilazione in tirosina (transfosforilazione) tra i recettori dimerizzati. A seguito dell'associazione delle fosfotirosine (P), mediata dai domini SH2, i trasduttori del segnale vengono attivati e trasmettono il segnale all'interno della cellula.

conformazione che permette l'interazione tra i substrati esogeni e il sito catalitico. Questo meccanismo regolatorio è probabilmente condiviso da altre famiglie recettoriali, quali quelle del recettore dell'HGF, dell'FGF e dell'NGF. In alcune famiglie di recettori, come quelli dell'insulina e dell'HGF, detti *auto-catalitici*, la fosforilazione di residui di tirosina nel dominio chinasi conduce anche a un aumento della V_{max} .

La trans/autofosforilazione del recettore può verificarsi anche esternamente al dominio catalitico, nell'inserto chinasi, se presente, nel dominio iuxtamembrana e nella coda C-terminale. La fosforilazione di questi residui forma siti di ancoraggio che vengono riconosciuti con alta affinità dai trasduttori citoplasmatici del segnale contenenti specifici domini (vedi oltre). La formazione di questi siti di ancoraggio attraverso la trans/autofosforilazione è probabilmente un requisito indispensabile per la trasduzione del segnale all'interno della cellula. L'attivazione della tirosina chinasi, in assenza della trans/autofosforilazione, non è sufficiente a indurre un effetto biologico. Questo è stato formalmente dimostrato nel caso del recettore dell'HGF (codificato dall'oncogene *MET*) che ha un unico sito di ancoraggio multifunzionale per i trasduttori, situato nella coda C-terminale, formato da una corta sequenza amminoacidica contenente due tirosine. La mutazione di queste due tirosine in fenilalanine dà luogo a un recettore la cui funzione chinasi è perfettamente conservata, ma la cui attività biologica è compromessa poiché non può interagire con i trasduttori intracellulari e attivarli. Infatti, il fenotipo di topi transgenici portatori di un recettore in cui queste tirosine sono mutate in fenilalanine è sovrapponibile a quello di topi in cui il recettore è stato eliminato attraverso il *knockout* del gene *MET*.

Il meccanismo della dimerizzazione e dell'attivazione recettoriale può essere alterato in numerose situazioni patologiche (Tabella 14.2). La presenza di un numero eccessivo di molecole recettoriali, dovuto ad amplificazione genica e/o ad aumento dell'espressione proteica, incrementa la probabilità di interazioni casuali e quindi di formazione di dimeri, anche in assenza di ligando. L'attivazione costitutiva dei recettori della sottofamiglia dell'EGF e dell'HGF è riscontrata in numerosi casi di carcinomi e in altre meno frequenti patologie neoplastiche. Un'altra alterazione responsabile dell'attivazione costitutiva delle chinasi recettoriali è la delezione parziale o totale del dominio extracellulare, che determina la rimozione di un dominio che normalmente svolge una funzione inibitoria sull'attivazione recettoriale. Anche in questo caso i recettori risultano deregolati e sono dotati di potere trasformante. Esempi sono rappresentati dai "recettori" tronchi dell'EGF, come quello codificato dall'oncogene virale *v-erb-b1* (veicolato dal virus dell'eritroblastosi aviaria) o quelli presenti in molte forme di glioblastoma multifforme umano.

Le tirosina chinasi recettoriali reclutano trasduttori del segnale che legano tirosine fosforilate

I trasduttori intracitoplasmatici del segnale si legano con alta affinità ai recettori fosforilati per mezzo di moduli

TABELLA 14.2 Recettori tirosin-chinasici la cui attivazione oncogénica è associata all'insorgenza di neoplasie o all'angiogenesi tumorale

Recettore	Attivazione oncogénica	Neoplasia/processo neoplastico associato
EGFR (ErbB1)*	Overespressione (amplificazione genica), delezioni del dominio extracell	Cancro mammario, ovarico polmonare e altri tumori epiteliali; tumori SNC
ErbB2 (HER2, Neu)	Overespressione (amplificazione)	Cancro mammario, ovarico, gastrico, polmonare e intestinale
ErbB3 (HER3)	Overespressione; attivazione costitutiva per eterodimerizzazione con ErbB2	Cancro mammario
ErbB4 (HER4)	Overespressione	Cancro mammario e ovarico
PDGFR-alfa	Overespressione (amplificazione)	Tumori SNC; cancro ovarico
PDGFR-beta	Traslocazione (TEL-PDGFR); overespressione	TEL-PDGFR: leucemia cronica
CSF-1 R (c-fms)	Mutazioni puntiformi; overespressione	Leucemie; cancro dell'utero; tumori SNC
Kit (SCFR)	Mutazioni puntiformi germinali e somatiche; piccole delezioni; overespressione	Tumori dello stroma gastrointestinale; leucemie e alterazioni preneoplastiche midollari; tumori del testicolo
VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk1), VEGFR3 (Flt4)	Espressione; overespressione	Angiogenesi tumorale; VEGFR3: anche tumori vascolari
FGFR1	Traslocazione (ZNF1 98-FGFR1); overespressione; mutazioni puntiformi	ZNF1 98-FGFR1: leucemie e linfomi; overespressione; mutazioni puntiformi malformazioni e displasie scheletriche
FGFR2	Overespressione (amplificazione); troncamento	Cancro gastrico, mammario, prostatico
EGFR3	Traslocazione che provoca iperespressione nelle plasmacellule; mutazioni puntiformi nella linea germinale	Traslocazione: mieloma multiplo; mutazioni germinali: nanismo acondroplastico**
FGFR4	Overespressione (amplificazione)	Cancro mammario e ovarico
TrkA	Traslocazioni (Tpm-TrkA, Tpr-TrkA, Tfg-TrkA)	Tumori tiroidei; tumori nervosi infantili
TrkC	Traslocazioni (Tel-TrkC)	Sarcomi infantili, leucemie
HGFR (Met)	Mutazioni puntiformi, germinali e somatiche; overespressione (amplificazione); traslocazione (Tpr-Met)	Mutazioni: cancro renale ed epatico; overespressione: tumori intestinali, tiroidei, epatici, muscolari; traslocazione: tumori gastrici
RON	Overespressione	Cancro epatico e intestinale
Eph A2, B2, B4	Overespressione	A2: Tumori cutanei (melanoma metastatico); B2: carcinomi tratto gastroenterico; B4: cancro mammario
TIE1	Overespressione	Tumori vascolari e gastrici
TIE2	Espressione	Angiogenesi tumorale
Ret	Traslocazioni e inversioni (PTC1, 2 ecc.; mutazioni puntiformi germinali e somatiche)	PTC: tumori tiroidei, soprattutto associati a radiazioni; mutazioni puntiformi germinali: MEN (neoplasie endocrine multiple) tipo 2A e 2B; cancro tiroideo familiare e sporadico

SNC: sistema nervoso centrale; * tra parentesi, sinonimi di uso corrente; ** non è una neoplasia.

specifici contenuti nella loro sequenza. Il più comune di questi è il cosiddetto dominio SH2 ("SRC homology region 2") che riconosce e lega corte sequenze amminoacidiche contenenti invariabilmente una tirosina fosforilata. La specificità di legame è garantita dalla sequenza di 3 o 5 amminoacidi a valle della tirosina fosforilata. L'associazione specifica di trasduttori contenenti domini SH2 determina quale via di trasduzione del segnale verrà attivata.

La struttura tridimensionale dei domini SH2 e la modalità di reclutamento della fosfotirosina sono state chiarite mediante cristallografia ai raggi X e risonanza magnetica nucleare. I domini SH2 sono strutture compatte formate da un centinaio di amminoacidi.

Grazie a studi strutturali e tramite l'analisi di librerie fosfopeptidiche è stato chiarito che la porzione C-terminale del dominio SH2 riconosce i tre amminoacidi immediatamente C-terminali alla fosfotirosina. Questo permette l'associazione ad alta affinità tra proteine contenenti

domini SH2 diversi e specifiche fosfotirosine presenti nella sequenza recettoriale. Di regola, la maggior parte dei recettori tirosina chinasi contiene numerose tirosine, fosforilabili a seguito dell'attivazione del recettore, situate nella coda C-terminale, nel dominio iuxtamembrana o in quello catalitico. Ciascuna fosfotirosina è seguita da una diversa sequenza consenso e lega di preferenza soltanto un trasduttore contenente un dominio SH2. Ad esempio, nel recettore del PDGF la sequenza pTyr-Val-Pro-Met lega in modo specifico il dominio SH2 della p85, subunità regolatoria della fosfatidilinositol-3-chinasi, mentre la sequenza pTyr-Ile-Ile-Pro lega il dominio SH2 della fosfolipasi C γ (PLC γ).

Oltre al dominio SH2, un altro modulo peptidico coinvolto nel reclutamento di sequenze peptidiche contenenti fosfotirosine è il dominio PTB (*Phospho-Tyrosine Binding*): meno comune dell'SH2, il PTB interagisce con alta affinità con fosfopeptidi in cui la pTyr è immediatamente preceduta dalla sequenza consenso Asn-Pro-X. Una corta

sequenza, formata da 5-8 amminoacidi idrofobici che precedono la tirosina fosforilata in direzione N-terminale, è responsabile della specificità di legame. Tuttavia, il PTB di alcune proteine può anche riconoscere peptidi in cui la tirosina non è fosforilata. Pertanto, il dominio PTB è considerato un motivo di riconoscimento di sequenze amminoacidiche con funzioni diverse rispetto all'SH2. Si trova, infatti, in proteine "adattatrici", come Shc e IRS1, la cui funzione è quella di reclutare i trasduttori in prossimità dei recettori tirosin-chinasici prima della loro attivazione.

La localizzazione dei trasduttori al versante interno della membrana plasmatica è cruciale per l'associazione ai recettori attivati. In alcuni casi questa localizzazione è ottenuta tramite una molecola lipidica legata all'N o al C-terminale: esempi sono i trasduttori codificati dagli oncogeni SRC o RAS. Sappiamo ora che i domini PH (*Pleckstrin Homology*) possono legare direttamente le teste cariche di specifici fosfoinositidi presenti nella membrana plasmatica, accoppiando, in questo modo, l'attività delle inositolchinas e delle fosfatasi alla regolazione dei segnali intracellulari. Sono dotate di domini PH molecole della famiglia delle GTPasi (dinamina), regolatori di Ras (Sos e GAP) e chinasi citoplasmatiche (β ARK).

Esistono due classi di trasduttori provvisti di domini SH2 (Figura 14.4). La prima definisce proteine che presentano un'attività enzimatica propria: ne sono esempio la fosfolipasi C- γ (PLC- γ), la tirosin-chinasi citoplasmatica codificata dal proto-oncogene c-SRC (pp60^{src}), le fosfotirosina-fosfatasi SH-PTP1 e SH-PTP2, l'attivatore delle GTP-asi (GAP), l'ubiquitina ligasi Cbl. Questa famiglia può essere estesa a una più recente classe di trasduttori del segnale, i quali sono contemporaneamente anche attivatori della trascrizione genica (STAT). La seconda raggruppa trasduttori contenenti domini SH2 privi di attività catalitica intrinseca; questi fungono da subunità regolatrici di molecole enzimatiche citoplasmatiche: esempi sono Grb2, Shc e p85, la subunità non catalitica della PI3-K.

Il legame delle proteine contenenti domini SH2 ai recettori tirosin-chinasici ha diverse conseguenze:

1. favorisce l'interazione del trasduttore con il dominio catalitico del recettore, abbassando la costante di Michaelis-Menten, K_m , per la reazione di fosforilazione in tirosina, come nel caso di PLC- γ -1;
2. induce modificazioni conformazionali del trasduttore, indipendenti dalla fosforilazione, che ne modulano l'attività, come nel caso di PI3-K;
3. recluta il trasduttore alla membrana plasmatica, permettendo l'interazione dello stesso con eventuali substrati a essa associati, quali chinasi lipidiche, idrolasi o lo scambiatore GTP/GDP SoS.

La trasduzione del segnale dalle molecole associate al recettore agli effettori finali, siano essi proteine citoplasmatiche o fattori che controllano l'espressione genica, coinvolge cascate enzimatiche e produzione di secondi messaggeri. Alcuni domini di sequenza conservata mediano la formazione di complessi supermolecolari tra i trasduttori. Tra questi, il più comune è il dominio SH3 (*SRC* homology region 3), che lega sequenze ricche in prolina. Il dominio SH3 è formato da circa sessanta amminoacidi, organizzati in due foglietti β principali, perpendicolari tra loro, contenenti un gruppo di residui aromatici conservati. Ciascun dominio SH3 lega sequenze poliproliniche che formano eliche sinistrorse di tipo II. Queste sequenze sono caratterizzate dalla ripetizione di motivi caratteristici PXXP in cui le due proline sono critiche per il legame ad alta affinità. Queste sequenze sono pseudo-simmetriche e legano il dominio SH3 in entrambe le orientazioni. Ciò espande il numero dei potenziali interattori e implica la possibilità di determinare diverse disposizioni spaziali delle proteine interagenti. Ulteriore specificità di legame è conferita dalle interazioni dei residui non prolinici del ligando con i due domini variabili che fiancheggiano i foglietti β idrofobici dell'SH3. I domini SH3 sono presenti praticamente in tutti i trasduttori del segnale dotati di gruppi SH2 sopra menzionati. Inoltre si trovano in numerose proteine del citoscheletro, il che implica un loro ruolo più ampio nel mediare interazioni proteina-proteina. Mentre l'associazione degli SH2 è regolata dalla fosforilazione della tirosina, processo

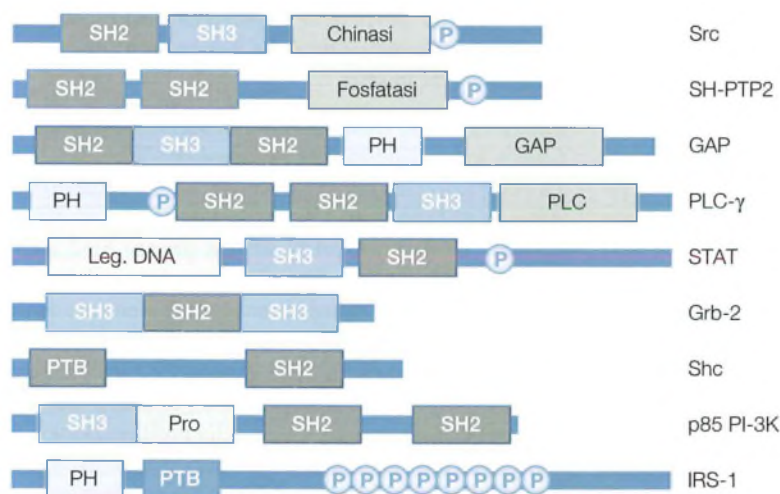


FIGURA 14.4 Struttura dei trasduttori del segnale che si associano ai recettori tirosin-chinasici attivati tramite domini che legano residui di fosfotirosina (SH2 o PTB). Alcuni sono dotati di attività enzimatica intrinseca (in grigio): Src (tirosin-chinasi), SH-PTP2 (fosfatasi), GAP (attivatore di GTPasi), PLC- γ (fosfolipasi), o sono fattori trascrizionali che legano il DNA (STAT). Gli altri sono adattatori che reclutano altre proteine del segnale al recettore e alla membrana plasmatica. Sono indicati i siti di fosforilazione in tirosina (P) e i domini conservati (SH3, Pro: sequenze ricche in prolina, PH) critici per le interazioni intermolecolari e la trasduzione del segnale.

rapidamente inducibile e reversibile, il legame dell'SH3 alle eliche poliproliniche è costitutivo e non sembra influenzato da modificazioni post-traduzionali.

Si è a lungo tentato di collegare un singolo recettore, o, almeno, una specifica via di trasduzione del segnale, a un unico e ben determinato effetto biologico. Ma i risultati sperimentali vanno in direzione opposta. Infatti, recettori e trasduttori diversi comunicano tra loro e influenzano reciprocamente i loro effetti. È verosimile che ciascuna risposta biologica non sia conseguenza di un unico specifico segnale, ma sia il risultato di più eventi capaci, nel loro insieme, di superare un livello di soglia. In questo contesto è più facile identificare segnali che siano un fattore limitante per una certa risposta biologica, piuttosto che trasduttori capaci, da soli, di evocare eventi complessi.

La via di trasduzione attivata da Ras svolge un ruolo fondamentale nel mediare segnali di proliferazione e di trasformazione neoplastica

La GTPasi Ras, inizialmente identificata come il prodotto degli oncogeni codificati dai virus del sarcoma murino di Harvey e Kirsten, è stata trovata mutata e costitutivamente attivata in numerosi tumori umani. Ras è una piccola proteina di 21 kDa, fisiologicamente espressa in tutte le cellule dell'organismo, che si associa alla membrana plasmatica attraverso una sequenza farnesilica aggiunta alla sua estremità C-terminale. Ras funziona come un interruttore cellulare, alternando uno stato attivo, in cui è legata al GTP, a uno stato inattivo, in cui è legato al GDP. Poiché l'affinità di Ras per il GDP è molto più alta di quella per il GTP, il complesso inattivo Ras-GDP si accumula nella cellula. A seguito dell'attivazione della maggior parte delle tirosina chinasi recettoriali, il livello del complesso Ras-GTP aumenta rapidamente e in modo significativo. La conversione tra la forma legata al GDP e quella legata al GTP è stimolata da proteine citoplasmatiche che agiscono come GNRF (*Guanine Nucleotide Realising Factors*) o scambiatori GDP/GTP. Il GNRF meglio caratterizzato, detto SoS, contiene sequenze amminoacidiche ricche in prolina capaci di associare con alta affinità i due domini SH3 di Grb2. Si pensa che Grb2 e Sos siano pre-associate nel citoplasma. A seguito della fosforilazione in tirosina, il complesso Grb2-SoS è reclutato al recettore e quindi alla membrana plasmatica, dove SoS può interagire con la molecola Ras. Dopo aver legato il GTP, Ras lo idrolizza con relativa lentezza, ritornando allo stato inattivo di Ras-GDP. L'attività enzimatica di Ras è incrementata da proteine attivanti le GTPasi, GAP, che si associano ai recettori fosforilati mediante domini SH2. Queste, da una parte modulano negativamente la via di Ras, dall'altra si comportano da effettori di Ras, legando e attivando numerose proteine intracellulari, alcune delle quali regolano le funzioni del citoscheletro. Ad esempio, la perdita del gene *NF1*, che codifica una proteina GAP detta neurofibromina, è responsabile di una sindrome tumorale familiare nota come neurofibromatosi di Recklinghausen.

Mutazioni puntiformi del gene *RAS* sono riscontrate frequentemente in numerosi tipi di tumori. Si tratta di

mutazioni attivanti che provocano o la diminuzione dell'attività GTPasica o la facilitazione dello scambio GDP/GTP. In entrambi i casi l'attività di stimolazione della proliferazione da parte di Ras diventa costitutiva.

Le vie di trasduzione del segnale a valle di Ras sono mediate da proteine che interagiscono con due corti domini N-terminali (noti come dominio effettore e *switch region II*). La via meglio studiata è quella mediata da Raf, che consiste in una cascata di attivazioni di serina/treonina chinasi. Raf contiene un sito di legame N-terminale (CR1) con cui si associa alla forma attivata di Ras, e un dominio serina/treonina chinasi C-terminale (CR2). Il meccanismo di attivazione di Raf è ancora poco compreso, ma è probabile che comporti sia il suo reclutamento alla membrana cellulare sia fosforilazioni in serina/treonina. Raf attivato fosforila e attiva MEK, una chinasi a doppia specificità capace di fosforilare sia residui di tirosina sia residui di treonina/serina. Il substrato più importante di MEK è le serina/treonina chinasi ERK/MAPK; questa, a sua volta, è attiva su numerosi substrati, che comprendono i fattori trascrizionali della famiglia del TCF. Questi ultimi inducono, tra l'altro, l'espressione del prodotto del proto-oncogene *c-FOS*, che forma il complesso trascrizionale AP-1. Il risultato finale è la stimolazione dell'espressione di geni responsabili del superamento del punto di restrizione tra la fase G1 e la fase S del ciclo cellulare, che porta alla duplicazione del DNA.

Una cascata chinastica parallela a quella Raf/MEK/ERK è sostenuta dalla chinasi MEK-1. In vivo questa non è attiva su MEK ma su una chinasi omologa, SEK. Il passo successivo è la fosforilazione e la stimolazione della chinasi SAPK/JNK, o Jun kinase, che attiva il fattore trascrizionale codificato dal proto-oncogene Jun. Alcune evidenze suggeriscono che l'attivazione di questa cascata di segnali possa passare da Ras attraverso la proteina G Rac, che pare necessaria per la trasformazione indotta da Ras. Tuttavia non è chiaro se la via di SAPK sia necessaria per stimolare la proliferazione cellulare.

Un altro effettore di Ras è la PI3-K (vedi oltre) la cui subunità catalitica associa Ras in maniera GTP-dipendente. Altri aspetti relativi a questi punti sono trattati nel capitolo 10.

La maggior parte delle tirosina chinasi recettoriali attivate stimola enzimi che generano secondi messaggeri lipidici

I più importanti tra questi enzimi sono la fosfolipasi (PL) C γ e la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI-3K).

La PLC γ idrolizza il fosfatidilinositolo 4,5 difosfato (PIP $_2$) generando l'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP $_3$) e il diacilglicerolo (DAG). È provvista di due gruppi SH2 e di un gruppo SH3 che permette l'associazione alle proteine del citoscheletro. Dopo essersi legata al recettore, la PLC γ subisce una fosforilazione in tirosina che ne incrementa l'attività enzimatica. Il DAG generato è un potente attivatore della proteina chinasi C (PKC), una serina/treonina chinasi coinvolta nel controllo della proliferazione e della trasformazione cellulare. PKC è il bersaglio di esteri del forbolo tumorigenici come il TPA. L'IP $_3$ regola la liberazio-

ne di calcio dai depositi intracellulari a scambio rapido. Il coinvolgimento della PLC γ nella trasmissione di segnali che portano alla duplicazione del DNA e alla divisione cellulare è ancora dibattuto.

La PI-3K è un regolatore chiave della mitogenesi e di altre attività correlate alla trasformazione neoplastica e all'invasione della matrice extracellulare durante la progressione tumorale. Inoltre, questo enzima gioca un ruolo centrale nella protezione dall'apoptosi (Figura 14.5). È stato scoperto che una PI-3K di origine retrovirale provoca emangiosarcomi aviari e trasforma cellule in coltura. La PI-3K è il capostipite di una superfamiglia di enzimi che fosforilano i fosfatidilinositoli in posizione D3. Sulla base della specificità del substrato sono state identificate tre classi di PI-3K: la classe I fosforila preferibilmente il fosfatidilinositolo 4,5 difosfato, la classe II il fosfatidilinositolo 4 fosfato e la classe III il fosfatidilinositolo. L'attività delle PI-3K di classe I è associata soprattutto a tirosina chinasi recettoriali, al complesso formato dall'antigene middle T (la principale proteina trasformante del polyomavirus) e alla pp60^{src}. Tra i membri della famiglia I il meglio caratterizzato è l'eterodimero formato dalla subunità regolatoria p85 con la subunità catalitica p110. A seguito dell'associazione di p85 al recettore fosforilato, la p110 si sposta in prossimità della membrana plasmatica, dove fosforila i fosfoinositidi

in posizione D3. I recettori tirosina chinasi possono attivare la PI-3K sia direttamente che indirettamente. Recentemente sono stati scoperti numerosi bersagli del fosfatidilinositolo-3-fosfato, per lo più coinvolti nel controllo della sopravvivenza cellulare, della proliferazione e del movimento. Questi contengono domini PH che legano fosfatidilinositoli. Una serin/treonin chinasi, Akt/PKB, è attivata direttamente dal fosfatidilinositolo 3,4 difosfato e dalla fosforilazione da parte di una chinasi, PDK1, che è a sua volta attivata dal fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato. Akt, la controparte cellulare dell'oncogene retrovirale *v-akt*, è responsabile della protezione dall'apoptosi mediata dalla PI-3K. La trasduzione del segnale a valle di Akt, benché non ancora perfettamente chiarita, coinvolge la fosforilazione della chinasi S6 che gioca un ruolo importante nella progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S. Altri bersagli della PI-3K sono alcuni membri della famiglia della serin/treonin chinasi C (PKC), in particolare ϵ e λ . Il PI(3,4,5)P₃ può attivare direttamente la PKC, oppure reclutare i suoi substrati e localizzarli alla membrana plasmatica, facilitandone la fosforilazione da parte della PKC. Infine la PI-3K è coinvolta nel controllo della riorganizzazione del citoscheletro e dell'adesione alla matrice extracellulare, entrambe responsabili della migrazione cellulare.

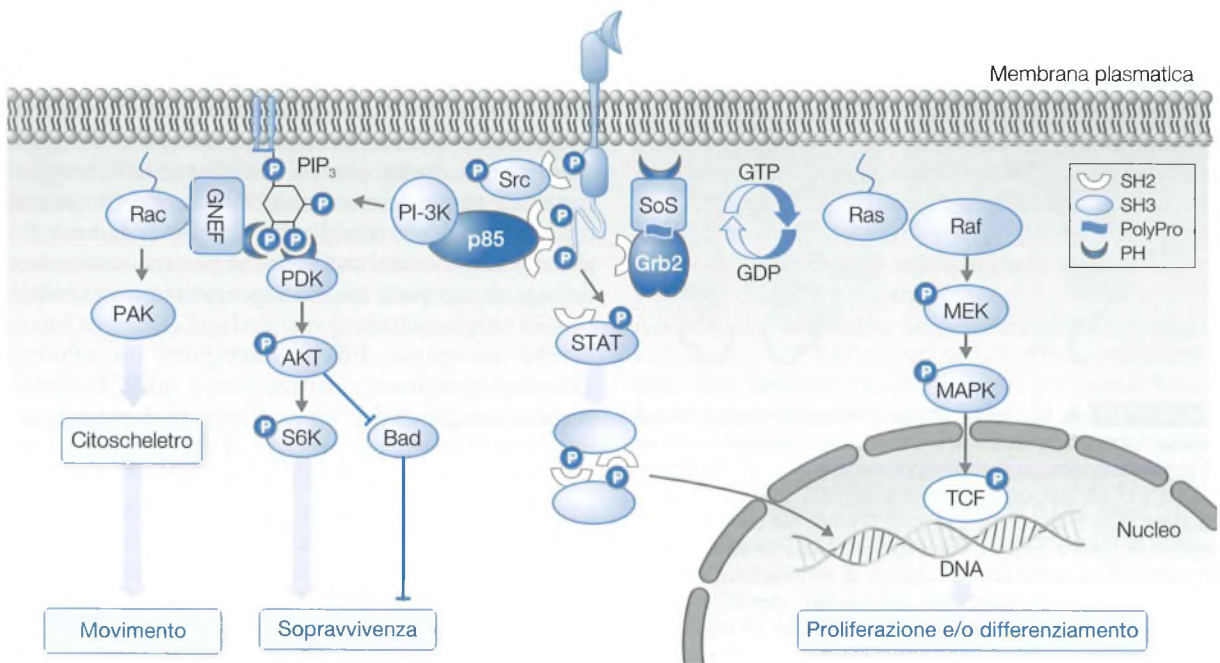


FIGURA 14.5 Vie di trasduzione principali attivate dai recettori tirosin-chinasi. La molecola Grb2 si associa alla tirosina fosforilata per mezzo del dominio SH2 e, tramite i due domini SH3, alla molecola SoS. Questa innesca la cascata Ras-Raf-MEK-MAPK chinasi che termina con l'attivazione di fattori trascrizionali che modulano l'espressione genica. STAT, fosforilata in tirosina dalla chinasi recettoriale, forma dei dimeri che traslocano al nucleo e fungono da fattori trascrizionali. Sia la via di Ras che quella di STAT sono coinvolte nel controllo della proliferazione cellulare e del differenziamento. P85, che contiene due domini SH2, recluta la chinasi PI3-K che fosforila i fosfoinositidi in posizione D3. Questi legano proteine contenenti domini PH, come la chinasi PDK, che attiva AKT e altre chinasi. Questa via è responsabile della protezione da apoptosi e della sopravvivenza cellulare. Un'altra molecola contenente il dominio PH è lo scambiatore GTP/GDP (GNEF) che attiva Rac. Questo, tramite chinasi come PAK, agisce su proteine del citoscheletro e regola il movimento cellulare. La tirosina chinasi citoplasmatica Src è associata e attivata dai recettori direttamente. Src è coinvolta nel controllo del movimento cellulare, della protezione da apoptosi e della proliferazione, con modalità non ancora note. Le frecce nere indicano che il trasduttore esplica una attività enzimatica sul suo bersaglio, che porta alla fosforilazione di amminoacidi (tirosina, serina o treonina) (P) o di inositoli.

Le tirosina chinasi citoplasmatiche

Le tirosina chinasi citoplasmatiche sono enzimi ancorati alla membrana cellulare da gruppi lipidici; sono normalmente associate e attivate da numerosi recettori transmembrana, compresi la maggior parte di quelli tirosina chinasi, e regolano, con meccanismi in gran parte ignoti, diversi eventi cellulari quali proliferazione, protezione da apoptosi e invasività. Esse fanno parte di una famiglia comprendente almeno dieci membri altamente omologhi. Sulla base della distribuzione della loro espressione sono suddivise in tre gruppi. Src, Fyn e Yes, che sono espresse praticamente in tutti i tipi cellulari; Blk, Fgr, Hck, Lck e Lyn che si trovano soprattutto nelle cellule ematopoietiche; il gruppo di Frk che è espresso negli epitelii. Il prodotto del proto-oncogene SRC, pp60^{SRC}, è stato quello che ha permesso l'identificazione di questa famiglia.

Prendendo a modello la tirosina chinasi Src esse sono formate da sei domini funzionali diversi (Figura 14.6A). Partendo dall'estremità N-terminale ci sono un dominio conservato (SH4), la "regione unica", un SH3, un SH2, un dominio catalitico e una breve estremità C-terminale contenente un residuo di tirosina. Il dominio SH4 è una breve sequenza amminoacidica contenente un segnale di miristilazione, che permette l'ancoraggio alle membrane

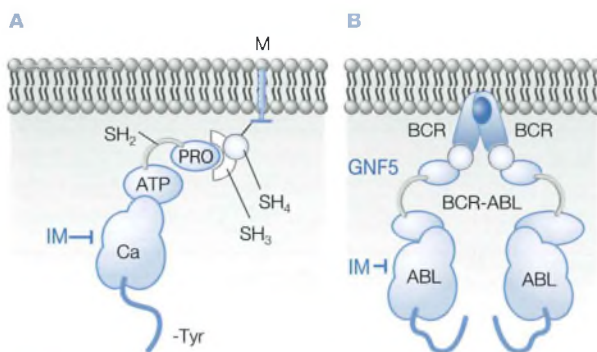


FIGURA 14.6 **A.** La tirosina chinasi cellulare non recettoriale di tipo Src è formata da sei domini funzionali. Partendo dall'estremità N-terminale ci sono un dominio conservato (SH4), la "regione unica", un SH3, un SH2, un sito di legame per l'ATP (ATP), un dominio catalitico (Ca) e una breve estremità C-terminale contenente un residuo di tirosina (-Tyr). Il dominio SH4 è una breve sequenza amminoacidica contenente un segnale di miristilazione, che permette l'ancoraggio alle membrane cellulari (M). I domini SH3, SH2 e la coda C-terminale partecipano a una complessa regolazione intramolecolare dell'attività catalitica di Src. In condizioni di riposo, la tirosina C-terminale (-Tyr) lega con alta affinità il dominio SH2 della stessa molecola e il sito Ca è legato a PIP₂, favorendo una conformazione chiusa e inattiva (non mostrata in figura). Questa è ulteriormente stabilizzata dalle interazioni tra il dominio SH3, il dominio catalitico e una regione adiacente contenente una sequenza ricca in prolina (Pro). Quando la tirosina al C-terminale è defosforilata, tramite un meccanismo ancora poco chiaro, il dominio SH2 viene liberato e la chinasi passa alla forma attiva. **B.** Nella leucemia mieloide cronica la fusione dei due cromosomi 9 e 22 porta alla formazione di una proteina, costituita da BCR e parte di ABL (BCR-ABL) che dimerizza spontaneamente e risulta sempre attivata. Nelle figure sono anche indicati i punti di inibizione da parte di imatinib (IM) e GNF-5.

cellulari. La "regione unica" è quella più variabile tra i membri della famiglia Src. I domini SH3, SH2 e la coda C-terminale partecipano a una complessa regolazione intramolecolare dell'attività catalitica di Src. In condizioni di riposo, la tirosina C-terminale, fosforilata dalla chinasi citoplasmatica Csk, lega con alta affinità il dominio SH2 della stessa molecola, favorendo una conformazione chiusa e inattiva. Questa è ulteriormente stabilizzata dalle interazioni tra il dominio SH3, il dominio catalitico (Ca) e una regione adiacente contenente una sequenza ricca in prolina (Pro).

In questa regolazione negativa ha un ruolo importante il legame con PIP₂ di membrana.

Quando la tirosina al C-terminale è defosforilata, tramite un meccanismo ancora poco chiaro, il dominio SH2 viene liberato e la chinasi passa alla forma attiva. Per ottenere la completa attività enzimatica è indispensabile la fosforilazione di una tirosina conservata, contenuta nel dominio catalitico (Figura 14.6A).

Le fosfotirosine dei recettori tirosina chinasi attivati competono per il legame al dominio SH2 di Src, rimuovendone l'interazione inibitoria con la coda C-terminale. L'associazione tra Src e le tirosina chinasi recettoriali comporta la fosforilazione della tirosina del dominio catalitico di Src, dotata di funzioni regolatorie positive. L'oncogene trasformante v-src, isolato dal virus del sarcoma di Rous, è privo della estremità inibitoria C-terminale e presenta un'attivazione enzimatica costitutiva.

La ridondanza dei rappresentanti della famiglia di Src nella stessa cellula e la mancanza di inibitori selettivi, rende difficile definire le attività biochimiche e biologiche specifiche di queste chinasi. D'altra parte, la maggior parte delle tirosina chinasi recettoriali associa e attiva una o più proteine della famiglia di Src. L'uso di mutanti dominanti negativi ha dimostrato che per una trasduzione del segnale completa sono indispensabili queste tirosina chinasi citoplasmatiche.

Benché sia spesso difficile distinguere tra substrati fosforilati direttamente dai recettori e quelli fosforilati successivamente da Src, un gran numero di proteine intracellulari è potenziale bersaglio di Src. Tra questi, FAK (chinasi delle adesioni focali) è parte di un complesso sistema di trasduzione associato alle integrine, recettori che controllano i rapporti cellula-matrice extracellulare. La FAK attivata, a sua volta, recluta Grb2 stimolando la via mediata da Ras/MAPK. Durante la generazione del movimento cellulare, Src stimola la formazione di lamellipodi e membrane ruffles. Questo effetto pare essere mediato dall'attività di PI3-K e Rac, entrambe elevate in cellule trasformate da Src. L'attivazione di Ras/MAPK e PI3-K è indispensabile per il movimento cellulare, la proliferazione e la protezione da apoptosi mediata da Src (vedi Capitoli 10 e 16).

La leucemia mieloide cronica, una espansione clonale massiccia delle cellule mieloidi, è provocata da una anomalia genetica, chiamata cromosoma Philadelphia, che consiste nella traslocazione reciproca delle due braccia lunghe dei cromosomi 9 e 22. Questo provoca la formazione di un nuovo gene, composto da una parte

del gene *BCR* e una parte del gene *ABL*. Ne risulta una proteina dimerizzata (Bcr-Abl), con attività tirosina chinasi costituzionalmente sempre attiva (P) che darà origine a un segnale intracellulare molto intenso e persistente che induce proliferazione e resistenza all'apoptosi (Figura 14.6B). Gli inibitori competitivi delle tirosina chinasi che si legano al sito dell'ATP (Figure 14.6 e 14.7) sono molto attivi in questa patologia. Purtroppo spesso le cellule leucemiche diventano resistenti a questi farmaci sviluppando delle mutazioni proprio nel sito della chinasi *ABL*. Recentemente si è osservato che un inibitore allosterico della chinasi *BCR-ABL*, lo *GNF-5* (Figura 14.7), coopera con i classici inibitori competitivi delle chinasi bloccando sia i siti originali che quelli mutati dando ulteriori possibilità terapeutiche.

Le tirosina fosfatasi modulano l'attività delle tirosina chinasi e giocano ruoli importanti nella trasduzione del segnale

Le tirosina chinasi recettoriali attivate associano enzimi, contenenti gruppi SH2, dotati di attività fosfoprotein-fosfatasi. Le due tirosina fosfatasi meglio caratterizzate sono la SH-PTP1 e la SH-PTP2. La prima è anche nota come PTP-1C o SHP o HCP ed è espressa praticamente solo in cellule ematopoietiche e in alcuni tessuti epiteliali. Al contrario la SH-PTP2 (anche nota come Syp o PTP-2C) è presente nella maggior parte dei tipi cellulari. Entrambe si associano ai recettori fosforilati e vengono da questi attivate tramite fosforilazione. Tuttavia, sembra che giochino ruoli opposti nella trasduzione del segnale: la SH-PTP1 defosforila le tirosina chinasi recettoriali e pare essere coinvolta nella regolazione negativa del segnale. Al contrario, la SH-PTP2 sembra attivare una via di trasduzione del segnale positiva che è ancora sconosciuta. Probabilmente questa comporta la defosforilazione della fosfotirosina presente nella coda C-terminale di Src, dotata di attività regolatoria negativa.

Un membro della famiglia delle fosfatasi recentemente scoperto, chiamato *PTEN*, è il prodotto di un gene oncosoppressore, le cui mutazioni sono responsabili di tumori ereditari (sindrome di Cowden) e non. Questo enzima, benché non contenga gruppi SH2, pare ricopra un ruolo molto importante nel regolare negativamente la trasduzione del segnale. Infatti può defosforilare fosfoerina, fosfotirosina e inositidi fosforilati in D3 dalla PI-3K. Sembra che, a seguito delle mutazioni ritrovate nei tumori, *PTEN* sia incapace di idrolizzare il fosfatidilinositolo trifosfato. Ne consegue iperattivazione della proteina chinasi Akt e abnorme protezione dall'apoptosi.

Trasduttori del segnale e attivatori trascrizionali stimolano la trascrizione genica

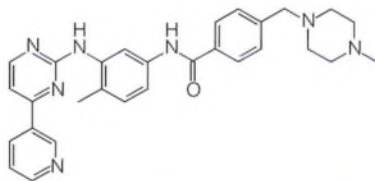
Le tirosina chinasi recettoriali attivano una via di trasduzione del segnale che stimola direttamente la trascrizione genica. Questa via è mediata da molecole dette trasduttori del segnale e attivatori trascrizionali (STAT), una famiglia di proteine citoplasmatiche di cui sono note almeno sei isoforme. Inizialmente identificate come trasduttori del segnale dei recettori per le citochine nel sistema ematopoietico, le isoforme 1, 3, 5 sono espresse in modo ubiquitario e coinvolte nella trasduzione del segnale dei recettori tirosina chinasi. Le proteine STAT sono dotate di una regione legante il DNA all'estremità N-terminale, seguita da un dominio SH3, un dominio SH2 e da una sequenza contenente un residuo di tirosina al C-terminale. A seguito della fosforilazione in tirosina, la sequenza C-terminale lega con alta affinità il dominio SH2 di un'altra molecola STAT, formando omo o eterodimeri. I dimeri traslocano al nucleo e stimolano la trascrizione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e nel differenziamento. Tra questi ci sono *FOS*, che codifica un fattore trascrizionale e *WAF-1*, il cui prodotto regola in modo negativo la progressione del ciclo cellulare.

A seguito dell'attivazione dei recettori delle citochine, la fosforilazione di STAT è mediata dalle chinasi citoplasmatiche della famiglia JAK. Al contrario, le tirosina chinasi recettoriali possono fosforilare e attivare direttamente le STAT. Un'ulteriore modulazione dell'attività di queste molecole è causata dalla fosforilazione in serina da parte delle MAPK. Nelle cellule epiteliali le STAT sono fattori trascrizionali critici per il differenziamento terminale.

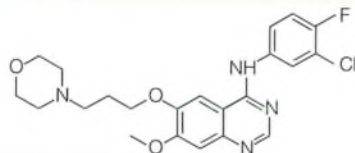
Approcci farmacologici al controllo dell'attività dei recettori per i fattori di crescita

Durante gli ultimi decenni, il miglioramento della nostra conoscenza dei meccanismi responsabili dello sviluppo del cancro ha portato alla introduzione di nuove promettenti strategie di trattamento, il cosiddetto "targeting molecolare", che utilizza farmaci progettati per agire su molecole specifiche, individuate come critiche per il mantenimento dello stato neoplastico. Lo sviluppo di inibitori, soprattutto anticorpi monoclonali e piccole molecole, diretti contro gli oncogeni attivati è stato l'approccio più

Imatinib



Gefitinib



Erlotinib

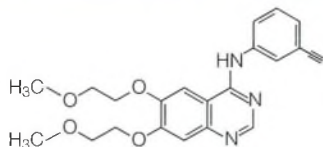


FIGURA 14.7 Formula di struttura di alcuni inibitori competitivi del sito catalitico delle tirosina chinasi.

utilizzato per questo tipo di trattamento. Tra gli oncogeni implicati nei tumori umani, le tirosina chinasi giocano un ruolo critico (Tabella 14.2). Questa osservazione, insieme con la scoperta che le cellule tumorali possono essere dipendenti per la loro sopravvivenza dalla continua espressione di oncogeni attivati (un concetto definito come "dipendenza oncogènica" o "oncogene addiction"), ha reso le tirosina chinasi bersagli ideali per la terapia mirata nei tumori.

I principi su cui si basano le terapie mirate sono i seguenti: a) il bersaglio molecolare deve essere presente e alterato (qualitativamente o quantitativamente) nelle cellule tumorali; b) l'inibizione del target è in grado di provocare la morte delle cellule tumorali o, almeno, di bloccarne l'ulteriore crescita; c) il farmaco molecolare deve essere poco attivo sulle cellule normali e, quindi, non molto tossico per il paziente. Il tasso di risposta alle terapie mirate, quindi, dipende dallo stato di attivazione e dal ruolo del bersaglio selezionato nello sviluppo e nella progressione tumorale. I risultati più efficaci si osservano solitamente quando le molecole alterate hanno un ruolo causale o determinante per il mantenimento dello stato trasformato, mentre effetti minori si osservano quando il bersaglio è parte di una via di trasduzione importante ma non indispensabile. È importante sottolineare che l'attivazione aberrante della molecola bersaglio – in genere dovuta a mutazioni, amplificazione, e/o a iperespressione – di solito è un predittore di risposta agli inibitori. Queste osservazioni devono essere tenute in considerazione non solo per la selezione delle molecole bersaglio nell'ambito di un tipo di tumore, ma anche per la selezione dei pazienti. In altre parole, la terapia molecolare implica una personalizzazione della terapia che ha come prerequisito la dimostrazione che la molecola bersaglio alterata è presente nel tumore del paziente che si intende trattare.

Anticorpi monoclonali

Le principali strategie utilizzate in clinica per inibire le tirosina chinasi sono gli anticorpi monoclonali e i piccoli inibitori delle chinasi

Gli anticorpi monoclonali (mAb) sono stati ampiamente utilizzati in clinica e hanno mostrato risultati promettenti (Tabella 14.3). Il vantaggio principale di queste molecole è la loro elevata specificità.

In generale, i mAb sono stati utilizzati per:

- immunoterapia del cancro; questi monoclonali hanno lo scopo di attivare il sistema immunitario contro le cellule tumorali, grazie alla capacità di promuovere la citotossicità complemento dipendente (CDC), la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) e l'induzione diretta di apoptosi;
- impedire l'interazione tra i recettori e i loro specifici fattori di crescita; ci sono molti meccanismi grazie ai quali questi mAb esercitano i loro effetti terapeutici: a) legame con il ligando o il recettore al fine di impedire l'interazione ligando-recettore; b) legame con il recettore e successiva internalizzazione recettoriale; c) rilascio proteolitico della porzione extracellulare

TABELLA 14.3 Anticorpi monoclonali approvati dall'FDA in terapia antineoplastica

Nome	Target	Approvato per il trattamento di
Cetuximab (Erbix)	EGFR	Colon carcinoma Carcinoma testa collo
Panitumumab (Vectibix)	EGFR	Colon carcinoma Carcinoma testa collo
Trastuzumab (Herceptin)	HER2/Neu	Carcinoma mammella
Bevacizumab (Avastatin)	VEGF	Carcinoma mammella Carcinoma coll Non-small cell lung cancer Glioblastoma multiforme

Da: Wakeling AE. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:382-7.

del recettore; d) inibizione della dimerizzazione del recettore; si ritiene che ogni mAb agisca attraverso più di un meccanismo;

- coniugazione con sostanze radioattive o farmaci che devono essere veicolati al tumore.

Anche se gli anticorpi hanno dato ottimi risultati nella pratica clinica, essi presentano anche alcuni svantaggi: ad esempio, non sempre sono in grado di raggiungere in modo efficiente tutte le cellule all'interno del tumore, sia perché l'aumento della pressione interstiziale all'interno del tumore compromette la corretta distribuzione dei mAb, sia perché non tutte le cellule esprimono l'antigene allo stesso livello (distribuzione eterogenea dell'antigene) o, infine, perché le cellule tumorali hanno la capacità di cambiare il tipo di recettore espresso. Un altro problema che è stato osservato è la comparsa di tossicità, spesso dovuta all'inibizione del bersaglio molecolare in cellule normali in cui la sua attività è fondamentale per il funzionamento efficiente del tessuto. Un esempio importante è quello della cardiotossicità osservata dopo trattamento del carcinoma della mammella con il trastuzumab.

Inibitori delle tirosina chinasi

La maggior parte degli inibitori delle chinasi (*small tyrosine kinase inhibitors*) sviluppati finora sono competitori dell'ATP. Essi interagiscono con il sito di legame dell'ATP nel dominio chinasi, imitando i legami idrogeno normalmente formati dall'adenina dell'ATP. Gli inibitori di tipo 1 si legano alla conformazione attiva, mentre gli inibitori di tipo 2 riconoscono la forma inattiva dell'enzima. Gli inibitori covalenti sono considerati più potenti degli inibitori competitivi. Anche se sono anch'essi ATP mimetici, formano legami covalenti irreversibili con il sito attivo della chinasi. Poiché le proteina chinasi presentano forti omologie nel sito di legame dell'ATP, sia gli inibitori reversibili sia quelli non reversibili spesso non sono specifici per una singola chinasi e mostrano reattività crociata con altri enzimi. Altri inibitori hanno il loro sito di legame al di fuori della tasca per l'ATP e sono in grado di bloccare la conformazione dell'enzima in uno stato inattivo. Questi inibitori allosterici mostrano la più

alta selettività, poiché la loro regione di legame presenta bassa omologia di sequenza tra le proteina chinasi.

All'inizio dell'era delle "terapie target" si è creduto che sarebbe stato difficile identificare inibitori abbastanza selettivi per un singolo bersaglio molecolare e capaci di fornire un sufficiente indice terapeutico. Oggi, la progettazione di inibitori delle chinasi trae vantaggio dall'introduzione di sofisticati approcci cristallografici e proteomici e di nuovi test di screening. Allo stesso tempo, molti sforzi sono stati dedicati all'identificazione e alla validazione dei bersagli molecolari più appropriati. A titolo esemplificativo verranno qui trattate le strategie terapeutiche adottate per interferire con l'attivazione di due classi paradigmatiche di recettori: quella della famiglia dell'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), che ha come scopo principalmente quello di inibire direttamente la proliferazione delle cellule tumorali, e quella del VEGFR (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) che ha lo scopo di inibire la neo-vascolarizzazione del tumore (Tabella 14.4).

I recettori per fattori di crescita come bersaglio di farmaci antitumorali

La famiglia dell'EGFR è assai importante nella genesi dei tumori

I membri della famiglia dell'EGFR sono – storicamente – i primi recettori tirosina chinasi per i quali è stato dimostrato un ruolo nella genesi dei tumori e, pertanto, sono stati ampiamente utilizzati come bersagli di terapie anti-neoplastiche.

L'EGFR è attivato da mutazioni o sovraespressione nei carcinomi di polmone, mammella, stomaco, testa-collo e colon, e nel 40-50% dei glioblastomi multiformi. Sono attualmente utilizzate o in fase di studio molte strategie volte a inibire l'EGFR, tra cui l'utilizzo di anticorpi monoclonali, inibitori della tirosina chinasi, tossine coniugate al ligando e molecole antisense.

Cetuximab è un anticorpo monoclonale diretto contro un epitopo extracellulare di EGFR e inibisce competitivamente il legame dei ligandi EGF e TGF α al recettore. È stato approvato come monoterapia o in associazione

con radioterapia o altre terapie convenzionali per il trattamento del carcinoma metastatico del colon-retto e del carcinoma a cellule squamose del distretto testa e collo. *Panitumumab* è stato il primo anticorpo monoclonale umanizzato approvato per il trattamento di pazienti in associazione con chemioterapici. Questo anticorpo è interessante in quanto ha una affinità di legame superiore a cetuximab, è un inibitore di EGFR più potente di cetuximab, ha una più lunga emivita ed è meno immunogenico. Gli studi clinici che hanno utilizzato piccole molecole che inibiscono l'attività chinasi di EGFR nei pazienti con carcinoma polmonare in stadio avanzato hanno mostrato che circa l'80% dei pazienti con mutazioni di EGFR presentano risposte cliniche rapide e durevoli, totali o parziali. È stato dimostrato che le mutazioni di EGFR identificate nei pazienti sono di tipo attivante e che aumentano la sensibilità agli inibitori di EGFR. Un'altra delle lezioni apprese da studi clinici con inibitori dell'EGFR è l'importanza della selezione dei pazienti. In realtà, quasi esclusivamente i pazienti i cui tumori mostrano mutazioni di EGFR presentano risposte positive agli inibitori, in termini di sopravvivenza globale e sopravvivenza libera da malattia. Sulla base di vari studi effettuati in diversi tumori, tre inibitori di EGFR sono ora approvati per la terapia antineoplastica: *gefitinib*, *erlotinib* e *lapatinib*. HER2, un recettore privo di ligando della famiglia di EGFR, si attiva per etero-dimerizzazione con un altro membro della famiglia. L'amplificazione del gene HER2 determina iperespressione della proteina in circa il 25% dei carcinomi mammari e correla con un fenotipo aggressivo e una prognosi negativa. Le terapie molecolari approvate nei tumori metastatici della mammella con amplificazione di HER2 sono il mAb trastuzumab (diretto contro il dominio extracellulare di HER2), e lapatinib, un inibitore dell'attività enzimatica di EGFR e HER2. Recentemente, trastuzumab è stato approvato, in combinazione con la chemioterapia, nella terapia adiuvante. Nuovi mAb anti-HER2 (pertuzumab ed ertumaxomab) sono attualmente valutati in studi clinici.

Il VEGFR controlla la formazione dei vasi ed è essenziale per lo sviluppo dei tumori

Il sistema vascolare si forma attraverso due processi: la *vasculogenesi* e l'*angiogenesi*.

La *vasculogenesi* è la formazione della rete vascolare primitiva nell'embrione, a partire da cellule progenitrici, dette angioblasti, che si differenziano intorno alla terza settimana dopo il concepimento. Il VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), tramite il VEGFR2, regola la proliferazione degli angioblasti; tramite il VEGFR1, induce la morfogenesi dei capillari primitivi. I recettori per le efrine regolano il differenziamento nei distretti vascolari arteriosi (che esprimono specificamente efrina B2 e il suo recettore) e venosi (che esprimono efrina B4 e il suo recettore).

L'*angiogenesi* è lo sviluppo di nuovi vasi a partire da vasi preesistenti, che si verifica sia nell'embrione, sia nella vita post-natale in condizioni fisiologiche (ciclo mestruale, crescita della placenta ecc.), di difesa e riparazione

TABELLA 14.4 Inibitori delle tirosina chinasi recettoriali approvati dall'FDA in terapia antineoplastica

Nome	Target	Approvato per il trattamento di
Gefitinib (Iressa)	EGFR	Non-small cell lung cancer
Erlotinib (Tarceva)	EGFR	Non-small cell lung cancer Carcinoma pancreatico
Lapatinib (TYKBR)	EGFR HER2/Neu	Carcinoma mammella
Sunitinib (Sutent)	PDGFR VEGFR1,2,3 Kit FLT3 CSF-1R RET	Tumori gastrointestinali Carcinoma renale
Pazopanib	VEGFR1,2,3	Carcinoma renale

(infiammazione, cicatrizzazione ecc.), e patologiche (alterazioni della vascolarizzazione retinica nei diabetici, neoplasie ecc.). L'angiogenesi richiede la degradazione della lamina basale del vaso parentale, cui segue la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali, la loro organizzazione in capillari e il reclutamento delle componenti periendoteliali della parete vascolare (cellule muscolari lisce). Il VEGF, tramite i recettori 1 e 2 presenti sulla superficie dell'endotelio, ne induce la proliferazione e l'organizzazione a formare strutture tubulari; l'angiopoietina 1, attraverso il recettore Tie2, stimola l'endotelio a reclutare le cellule muscolari lisce. L'angiopoietina 2, legando Tie2, provoca la destabilizzazione della parete vasale, cui segue regressione del vaso, o, in presenza di VEGF, gemmazione di un nuovo vaso.

Tramite la produzione di fattori di crescita angiogenetici, le cellule tumorali sono capaci di indurre la formazione dei vasi indispensabili per il rifornimento di ossigeno e metaboliti (un tumore non può sopravvivere senza vascolarizzazione quando supera il diametro di pochi

millimetri). La vascolarizzazione dei tumori solidi o "switch angiogenico" è considerata un evento critico nella progressione tumorale e coinvolge alcune molecole critiche tra cui il VEGF e i suoi recettori (VEGFR e NP-1). Poiché VEGF è un regolatore chiave dell'angiogenesi, molte terapie anti-angiogeniche ora in uso sono dirette contro questo fattore o il suo recettore. Il primo agente anti-angiogenico utilizzato con successo è stato l'anticorpo monoclonale anti-VEGF bevacizumab, che impedisce l'interazione del VEGF con i suoi recettori. Bevacizumab è attualmente approvato per i pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto (CRC) in combinazione con la chemioterapia e anche in pazienti affetti da carcinoma mammario, da carcinoma polmonare e da glioblastoma. Altre strategie anti-VEGF in corso di studio sono forme solubili di VEGFR e oligonucleotidi antisense anti-VEGF. Tra gli approcci diretti a inibire i recettori del VEGF, quello più sviluppato è l'uso di inibitori della tirosina chinasi anti-VEGFR. Sunitinib e sorafenib sono attualmente approvati per uso clinico.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Le tirosina chinasi recettoriali sono frequentemente alterate nei tumori umani, dove svolgono un ruolo importante nel sostenere la progressione tumorale.
- ▶ La deregolazione di questi recettori comporta l'attivazione costitutiva di vie di trasduzione a valle del recettore che ne sostengono la capacità oncogénica.
- ▶ Questi recettori possono essere inibiti con molecole che ne bloccano l'attività enzimatica (inibitori dell'attività tirosina chinasi) o con anticorpi monoclonali che impediscono l'interazione con il ligando o ne inducono la degradazione.

Bibliografia essenziale

- ▶ Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355-65.
- ▶ Cohen P. Protein kinases – the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:309-15.
- ▶ Dancey J, Sausville EA. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:296-313.
- ▶ Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:11-22.
- ▶ Fabbro D, Parkinson D, Matter A. Protein tyrosine kinase inhibitors: new treatment modalities? *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:374-81.
- ▶ Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- ▶ Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 1995;80:213-23.
- ▶ Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 2000;69:373-98.
- ▶ Hubbard SR, Mohammadi M, Schlessinger J. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 1998;273:11987-90.
- ▶ Hunter T. Signalling – 2000 and beyond. *Cell* 2000;100:113-27.
- ▶ Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:727-39.
- ▶ Matter A. Tumor angiogenesis as a therapeutic target. *Drug Discov Today* 2001;6:1005-23.
- ▶ Pawson T, Nash P. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev* 2000;14:1027-47.
- ▶ Schlessinger J. Cell signalling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103:211-25.

I recettori per le citochine

Massimo Locati

Obiettivi formativi

- Conoscere le principali famiglie di citochine e i loro recettori
- Conoscere il ruolo delle principali famiglie di citochine nella regolazione della risposta immunitaria
- Conoscere le possibili modalità di controllo farmacologico di citochine e loro recettori

Il termine citochine raggruppa un ampio numero di glicoproteine caratterizzate da notevole eterogeneità strutturale e funzionale, ma accomunate da dimensioni contenute e dalla capacità di agire come mediatori solubili nella comunicazione intercellulare in assenza di una attività effettrice diretta della molecola. Come intuibile da una tale definizione, il sistema citochine presenta confini molto sfumati nei riguardi di alcune altre famiglie di mediatori solubili. In senso stretto sono considerate citochine molecole prodotte o attive su cellule del sistema immunitario la cui funzione biologica predominante è rappresentata dalla modulazione di diversi aspetti della risposta immunitaria stessa, escludendo quindi ad esempio fattori di crescita non ematopoietici. Frequentemente questi mediatori sono prodotti da molti differenti tipi cellulari, sono attivi in modo pleiotropico su un numero ampio di cellule e tessuti, e agiscono prevalentemente in modo autocrino-paracrino (con un breve raggio d'azione) nei tessuti in cui vengono secreti. Questi aspetti distinguono le citochine dagli ormoni peptidici, che sono invece normalmente prodotti da un solo tipo cellulare e vengono veicolati dal torrente ematico per agire frequentemente su un ristretto pannello di target cellulari posti a distanza nell'organismo.

Classificazione delle citochine e dei loro recettori

Data la complessità e l'eterogeneità del sistema citochine, nessuna classificazione è di per sé in grado di fornire un quadro esaustivo. Nel tentativo di definire famiglie molecolari relativamente omogenee, verrà qui adottata una classificazione ibrida in cui sono integrati criteri

strutturali relativi al ligando e alla struttura recettoriale (Tabella 15.1).

Recettori ematopoietinici

I recettori ematopoietinici (per 4 α -helical bundles motif cytokines) sono eterotrimeri e segnalano attraverso tirosinchinasi della famiglia JAK

La risoluzione della struttura tridimensionale di molte citochine, resa possibile dalla disponibilità di molecole ricombinanti, ha consentito l'identificazione di una prima ampia famiglia di citochine accomunate da struttura basata su 1 o più moduli di 4 α eliche antiparallele (4 α -helical bundles, o emopoietine). Un primo ampio gruppo di molecole appartenenti a questa prima famiglia presenta strutture recettoriali costituite da eterodimeri, o più raramente trimeri, di catene a singolo dominio transmembrana caratterizzate da una struttura conservata che presenta in particolare 1 o più domini fibronectinici di tipo III e domini ematopoietinici nella porzione extracellulare e una sequenza conservata nella porzione immediatamente prossimale alla membrana (WSXWS) essenziale per l'attivazione recettoriale. Nella maggior parte dei casi in questi complessi recettoriali, detti "recettori ematopoietinici di classe I", la catena α riconosce selettivamente ma a bassa affinità una specifica citochina, mentre la catena β , associando la catena α , determina la creazione di una struttura recettoriale ad alta affinità e avvia il processo di trasduzione del segnale. La catena β è spesso comune a più citochine e consente quindi un'ulteriore sottoclassificazione (Figura 15.1). Si possono così identificare un primo sottogruppo di citochine che condividono la catena comune β CD131, che include interleuchina (IL)-3, IL-5 e il fattore di crescita

TABELLA 15.1 Tipi di recettori per citochine

Tipo	Caratteristiche strutturali e trasduzione del segnale	Principali ligandi
Recettori ematopoietinici di classe I	Presentano la sequenza WSXWS. Mancano di attività chinasi intrinseca Trasduzione: JAK/STAT	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, G-CSF, GM-CSF, CNTF, OSM, EPO, TPO, LIF
Recettori ematopoietinici di classe II	Mancano della sequenza WSXWS. Mancano di attività chinasi intrinseca Trasduzione: JAK/STAT	IFN α , IFN β , IFN γ , IL-10
Recettori con domini tirosinchinasici	Possiedono attività chinasi intrinseca Trasduzione: adattatori intracellulari (domini SH2)	EGF, PDGF, M-CSF, SCF, IGF-1, FGF
Recettori della famiglia di IL-1 R	Presentano domini TIR nella porzione intracellulare Trasduzione: adattatori intracellulari (domini DD)	Famiglia di IL-1, IL-18
Recettori della famiglia di TNF R	Presentano domini DD nella porzione intracellulare Trasduzione: adattatori intracellulari (domini DD)	TNF α , LT α , LT β , FasL, TRAIL, RANKL
Recettori per chemochine	Recettori a 7 domini transmembrana Trasduzione: proteine G eterotrimeriche (recettori convenzionali); arrestina (recettori atipici)	16 chemochine CXC, 27 chemochine CC, 1 chemochina CX3C, 1 chemochina C

Per le abbreviazioni vedi testo

per le colonie per le colonie granulocito-macrofagiche (GM-CSF), la cui attività biologica prevalente è quella di fattore di stimolazione di differenti colonie ematopoietiche midollari; un secondo sottogruppo di molecole che condivide la catena comune β gp130, che include IL-6, IL-11, il fattore neurotrofico ciliare (CNTF), oncostatina M (OSM), e il *Leucemia Inhibitory Factor* (LIF), con effetto sinergico con fattori stimolanti le colonie per la crescita e differenziazione di precursori ematopoietici e attività neurotrofica; un terzo sottogruppo che include citochine che condividono la catena comune γ_c CD132, quali IL-2, IL-15, IL-7, IL-9, IL-4, con un ruolo preminente nella differenziazione e regolazione funzionale di specifiche popolazioni linfocitarie. Appartengono alla famiglia delle emopoietine con recettori di classe I anche alcune molecole che non rispettano questa organizzazione generale. Tra queste IL-12, il cui complesso recettoriale è costituito da un eterodimero di cui una sola catena (IL-12R β 2) appartiene a questa classe di recettori, e IL-13, il cui complesso recettoriale è costituito da una catena recettoriale α selettiva (IL-13R α 1 o IL-13R α 2) e dalla catena α del recettore di IL-4 (IL-4R α). È interessante notare che IL-4 e IL-13 condividono molte proprietà biologiche tra cui il controllo della polarizzazione delle risposte immunitarie specifiche.

Infine i fattori ematopoietici eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO) e il fattore di crescita midollare per le colonie di tipo granulocitario (G-CSF), i cui recettori appartengono alla famiglia dei recettori di classe I ma hanno struttura monomeric, in cui l'attivazione della cascata di trasduzione del segnale è probabilmente dipendente da omodimerizzazione ligando-dipendente. Un secondo gruppo di molecole strutturate sul modulo delle 4 α eliche antiparallele include molecole con un ruolo fondamentale in diversi aspetti della risposta immune, tra cui l'attivazione di meccanismi di controllo di agenti infettivi virali a opera degli interferoni (IFN) α e β , l'attivazione e polarizzazione linfocitaria (IFN- γ) e lo spegnimento della risposta immune (IL-10). Queste

citochine sono riconosciute da un differente sottogruppo di strutture recettoriali eterotrimeriche dette "recettori ematopoietinici di classe II" in quanto condividono alcune proprietà strutturali con i recettori di classe I, tra cui la presenza di domini fibronectinici di tipo III nella porzione extracellulare, ma mancano dei domini ematopoietinici e della sequenza conservata WSXWS. I recettori ematopoietinici di classe I e II mancano di attività enzimatiche nella porzione intracitoplasmatica, e per segnalare necessitano di reclutare trasduttori intracellulari. Questi sono rappresentati dalle 4 tirosinchinasi della famiglia Janus (JAK1, 2, 3 e Tyk2), che presentano un'organizzazione strutturale conservata. La porzione amminoterminale della chinasi interagisce costitutivamente con il dominio intracitoplasmatico del recettore, la cui dimerizzazione a opera del ligando determina la trans-fosforilazione del loop di attivazione della chinasi a opera della controparte associata all'altra catena recettoriale e porta alla piena attivazione dell'attività chinasi presente nella porzione carbossiterminale della chinasi. In seguito ad attivazione JAK fosforila residui tirosinici presenti in JAK stessa e nella porzione intracitoplasmatica del recettore, che interagendo con domini *Src Homology* (SH)2 presenti in membri della famiglia di STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) ne determinano il reclutamento nel complesso di trasduzione del segnale.

Recettori ad attività tirosinchinasica

Un numero significativo di citochine, eterogenee in quanto a struttura e funzione, è accomunato dalla capacità di interagire e attivare strutture recettoriali a singolo dominio transmembrana dotate di un dominio ad attività tirosinchinasica nella coda intracitoplasmatica. Nella gran parte dei casi queste strutture recettoriali sono monomeri che presentano nella porzione extracellulare un numero variabile di domini di tipo differente al variare della citochina considerata. Nel sottogruppo I, cui appartiene il recettore dell'*Epidermal Growth Factor*

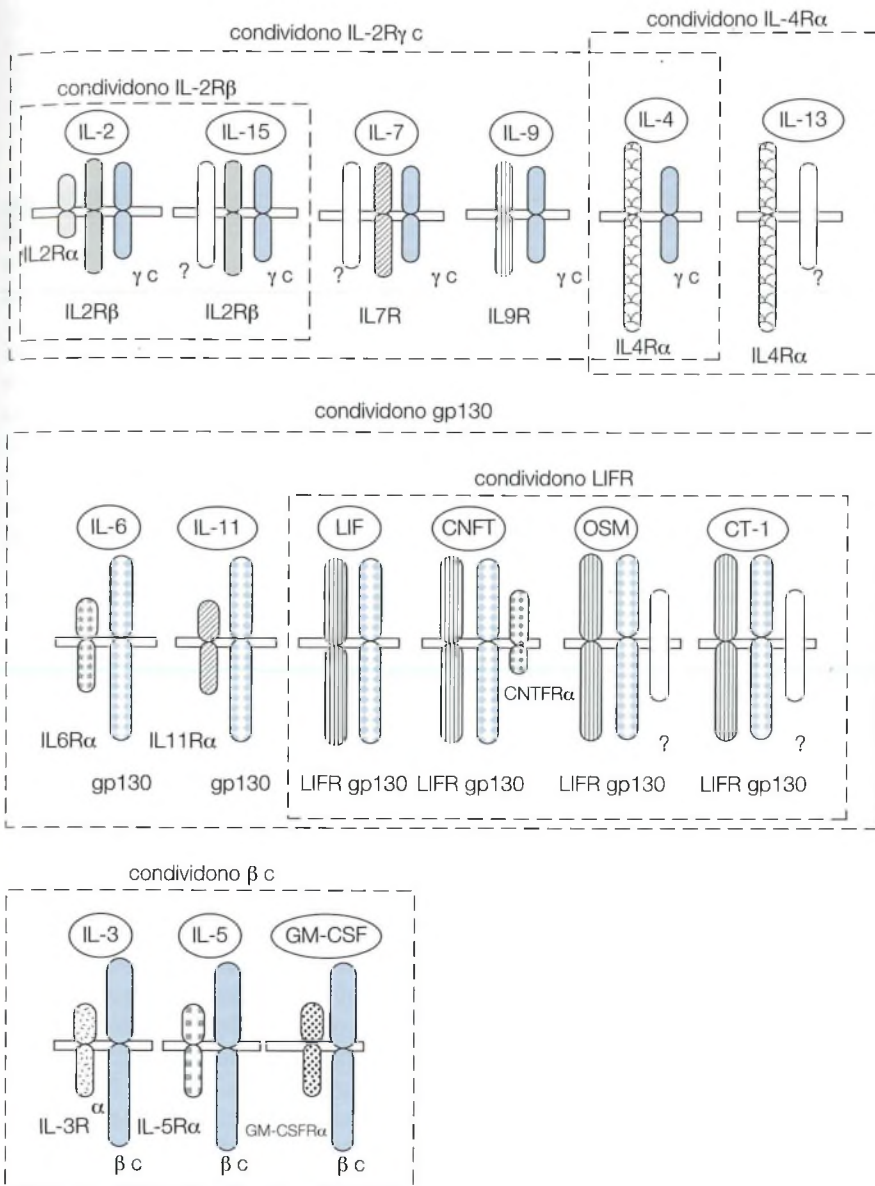


FIGURA 15.1 Condivisione delle catene recettoriali tra recettori per citochine. I recettori ematopoietinici sono frequentemente rappresentati da complessi eterodimerici, in cui la catena α è prevalentemente coinvolta nel riconoscimento selettivo di differenti citochine, mentre la catena β (blu) è frequentemente condivisa da più citochine ed è prevalentemente coinvolta nell'attivazione dei processi di trasduzione del segnale.

(EGF), è presente un numero variabile da caso a caso di domini ricchi in residui cisteinici, mentre nei sottogruppi III, (che include i recettori per il *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), per il fattore midollare di stimolazione delle colonie macrofagiche (M-CSF), e lo *Stem Cell Factor* (SCF), IV (che include i recettori del *Fibroblast Growth Factor* (FGF), e V (che include i recettori ad alta affinità per il *Nerve Growth Factor* (NGF), è presente un numero variabile di domini di tipo immunoglobulinico intervallati da domini strutturali di altra natura. Il sottogruppo II, cui appartiene il recettore di *Insulin Growth Factor* (IGF)-1, è invece strutturato come un eterotetramero $\alpha 2\beta 2$ la cui porzione extracellulare presenta domini ricchi in cisteina analoghi al sottogruppo I. La trasduzione del segnale di questa classe di recettori è avviata dalla oligomerizzazione recettoriale mediata dal ligando, frequentemente presente in forma dimerica, a cui segue l'autofosforilazione di residui tirosinici presenti nella

coda citoplasmatica del recettore. Si vengono a creare in questo modo residui di fosfotirosina riconosciuti da adattatori intracellulari dotati di domini SH2, quali GRB-Sos, che reclutano effettori a valle.

Recettori della famiglia di IL-1/IL-18-R

I recettori della famiglia di IL-1/IL-18-R (per β trefoil motif cytokines) presentano un dominio TIR nella porzione intracellulare e per segnalare richiedono il coinvolgimento di una proteina accessoria

Nell'uomo sono note a oggi 10 molecole appartenenti alla famiglia di IL-1/IL-18, ma le sole citochine per cui sono disponibili informazioni funzionali sono rappresentate dalla famiglia di IL-1 e IL-18. Queste molecole svolgono un ruolo centrale nelle risposte infiammatorie e sono accomunate da una organizzazione strutturale

conservata "a trifoglio" e dalla capacità di interagire con un distinto sottogruppo di recettori, strettamente relati ai recettori TLR (*Toll-Like Receptors*), rappresentati da molecole a singolo dominio transmembrana con 3 domini immunoglobulinici nella porzione extracellulare e un dominio TIR (*Toll-like /IL-1 Receptors*) in sede intracitoplasmatica. Sia per IL-1 che per IL-18 l'attivazione del segnale richiede, oltre a una prima catena recettoriale in grado di interagire con il ligando, una catena accessoria (AcP), non coinvolta nel binding recettoriale ma necessaria per il reclutamento dei trasduttori del segnale. Il sistema IL-1/IL-18 offre numerosi esempi di circuiti di regolazione negativa incentrati sulle strutture recettoriali. Nel caso di IL-1, ad esempio, oltre al recettore in grado di attivare la trasduzione del segnale (IL-1R tipo I), esiste un secondo recettore (IL-1R tipo II) prodotto da un gene indipendente, strutturalmente analogo a IL-1R tipo I nella porzione extracellulare, ma privo del dominio TIR intracellulare. Entrambi i recettori reclutano in modo ligando-dipendente AcP, ma determinano risultati funzionali opposti. Inoltre, oltre all'agonista (IL-1 α e IL-1 β), esiste una molecola strutturalmente relata che è riconosciuta dal recettore di tipo I ma che ne determina un blocco funzionale, ed è quindi indicata come recettore antagonista di IL-1 (IL-1ra). Una variante di questo approccio è presente per IL-18, che è riconosciuta dalla proteina circolante *IL-18 Binding Protein* (IL-18BP) che ne controlla l'attività biologica impedendone l'interazione con il recettore di membrana. Al centro della trasduzione del segnale di questa classe di recettori (e dei recettori TLR che attivano una trasduzione del segnale molto simile dopo attivazione conseguente al riconoscimento di molecole derivate da agenti patogeni nel corso di risposte infiammatorie) il dominio TIR, un dominio di interazione proteina-proteina presente nella porzione intracitoplasmatica del recettore che media il reclutamento della proteina adattatrice MyD88. A sua volta MyD88 è costituito da due domini di interazione proteina-proteina, un dominio TIR, che si associa al corrispondente dominio presente nella coda del recettore, e un dominio DD (*Death Domain*). Il dominio DD, un dominio originariamente identificato nel settore dei recettori della famiglia di TNF α , consente a MyD88 di reclutare alcune chinasi, denominate IRAK (per *IL-1 Receptor Activated Kinase*). Le IRAK fosforilano l'adattatore TRAF6 (*TNF Receptor Associated Factor 6*) che recluta chinasi diverse. A valle di TRAF6, la serin treonin chinasi TAK1 attiva NF- κ B, mentre un'altra via porta all'attivazione delle chinasi da stress JNK e p38. I geni attivati sono diversi e vanno da citochine infiammatorie (IL-1, IL-6) a chemochine infiammatorie (CXCL8, CCL2), molecole di adesione endoteliali, enzimi che producono molecole effettrici (monossido d'azoto sintasi inducibile, ciclo-ossigenasi di tipo II), molecole costimolatorie che attivano la risposta immunitaria (CD80). I recettori di membrana della famiglia di IL-1/IL-18 attivano quindi un programma genetico che porta all'attivazione dei geni proinfiammatori il cui significato è quello di amplificare i meccanismi di resistenza e di riparazione del tessuto.

Recettori della famiglia di TNF R

I recettori della famiglia di TNF R (jelly roll motif cytokines) trasducono messaggi diversi a seconda delle molecole adattatrici regolate

Le molecole appartenenti a questa famiglia presentano caratteristiche strutturali conservate (omologia di sequenza 25-30%) in funzione delle quali vengono espresse come molecole omotrimeriche di membrana di tipo II e sono rilasciate in versione solubile solo in seguito all'eventuale azione di specifiche metalloproteasi di membrana. Il capostipite di questa famiglia, il fattore di necrosi tumorale (TNF) α , deve il suo nome all'attività necrotizzante esplicita dei confronti di alcuni tumori sperimentali, ma l'effetto antitumorale non ne costituisce la principale attività biologica. TNF α interagisce con due tipi di recettori a singolo dominio transmembrana, detti TNF R1 o p55 e TNF R2 o p75, che presentano una significativa omologia di sequenza nella porzione extracellulare, basata sulla presenza di 4 domini ricchi in residui cisteinici, ma differiscono sensibilmente nella porzione intracitoplasmatica, che mediano segnali intracellulari e attività biologiche differenti. Mentre TNF R1 è fondamentalmente un recettore di morte, che attiva cioè un programma di morte apoptotica centrato sull'attivazione di una cascata di enzimi proteolitici detti caspasi (vedi oltre), TNF R2 è un recettore che attiva nella cellula un profilo trascrizionale di tipo infiammatorio e in parte inibisce il programma di morte cellulare attivata da TNF R1 (vedi anche Capitolo 27). Pur condividendo il ligando, l'attivazione delle due specie recettoriali, determinata dalla multimerizzazione delle catene recettoriali per interazione con il ligando omotrimerico, attiva differenti vie trasduzione del segnale. La cascata di trasduzione del segnale attivata da TNF R2 dipende dal reclutamento delle molecole adattatrici TRAF1 e TRAF2, che attivano le cascate chinasiche dipendenti da JNK e p38. TRAF2 media anche il reclutamento della chinasi RIP1 (*Receptor-Interacting Protein 1*), che attivando IKK β determina inattivazione di I κ B e in ultima analisi all'attivazione di NF κ B, con conseguente induzione di un programma genetico proinfiammatorio analogo a quello indotto da IL-1. Diversamente da TNF R2, TNF R1 non esprime significativa affinità per proteine TRAF, ma recluta TRADD (*TNFR1-Associated Death Domain*), un adattatore intracellulare a sua volta incapace di interagire con TNFR2. Il dominio DD di TRADD interagisce con l'omologo dominio DD di un secondo adattatore, la molecola FADD (*Fas-Associated Death Domain*), che infine recluta e attiva la caspasi 8, portando all'avvio del processo di morte cellulare programmata. Oltre a TNF α questa famiglia include a oggi altre 10 citochine, solo in parte caratterizzate, tra cui linfotossina α (LT α) e β (LT β), i ligandi di Fas (FasL, CD27 (CD27L), CD30 (CD30L), CD40 (CD40L), 4-1BB (4-1BBL), OX-40 (OX-40L), *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL) e *Receptor-Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL). Diversamente da TNF α , la gran parte di queste molecole non ha

un ruolo significativo nella risposta infiammatoria, ma ha in comune la capacità di regolare la vitalità cellulare. Queste molecole interagiscono con un crescente numero di recettori di membrana, strutturalmente analoghi a TNF R1.

Recettori per chemochine

I recettori per chemochine sono accoppiati a proteine G eterotrimeriche

I recettori per chemochine appartengono alla superfamiglia dei recettori a 7 domini transmembranari, la più ampia famiglia genica nell'uomo con oltre 800 componenti. Tuttavia le chemochine sono le sole citochine che utilizzano questo tipo di struttura recettoriale. La funzione primaria di questa ampia famiglia di mediatori (nell'uomo sono note 45 differenti chemochine) è rappresentata dall'induzione della migrazione direzionale della cellula (chemiotassi). Molte di queste molecole sono assenti in condizioni fisiologiche e sono indotte da stimoli infiammatori, mentre altre sono tonicamente prodotte e controllano la differenziazione e la ricircolazione linfocitaria. Inoltre le attività biologiche di molte chemochine sono influenzate da varie forme di modificazioni post-traduzionali, tra cui la processazione proteolitica, la citrullinazione e la nitrosilazione.

Sono state identificate due differenti classi di recettori per chemochine. La gran parte dei recettori è definita "convenzionale" e attiva una trasduzione del segnale mediata da proteine G eterotrimeriche, in preponderanza nella versione associata a subunità α di tipo inibitorio, come tipicamente si osserva a valle di recettori a 7 domini transmembranari (vedi anche Capitolo 13). In questa classe di recettori l'interazione con il ligando implica due eventi sequenziali. In una prima fase la chemochina interagisce con porzioni extracellulari del recettore, in particolare la porzione amminoterminale, in virtù di un'attrazione legata alla carica positiva del ligando e a una carica negativa recettoriale. Questa prima fase ("docking") non induce di per sé attivazione del recettore, ma è necessaria per l'attivazione di una seconda fase in cui l'agonista induce modificazioni strutturali nelle porzioni transmembrana del recettore che vengono stabilizzate dall'interazione con la porzione amminoterminale dell'agonista. Nella forma attiva il recettore innesca la cascata di trasduzione del segnale catalizzando lo scambio di una molecola di GDP a favore di una di GTP nella subunità α della G protein eterotrimerica. Il recettore attivato si comporta in altri termini quale "GDP/GTP exchange factor" per la G protein agganciata ai domini intracellulari. Le subunità α e β/γ attivano varie fosfolipasi (fosfolipasi $C\beta_2$, fosfolipasi A_2 , fosfolipasi D) e chinasi (fosfatidilinositolo-bisfosfato-3 chinasi, proteinchinasi C) e avviano il processo di riorganizzazione e polarizzazione del citocheletro che sostiene il movimento direzionale della cellula. Inoltre vengono attivati segnali non ben definiti che agiscono sulla porzione intracitoplasmatica di molecole integriniche leucocitarie, aumentandone l'affinità di legame per

il controrecettore endoteliale (vedi anche Capitolo 16). Questo evento consente una adesione ferma del leucocita all'endotelio vascolare ed è essenziale per il processo di reclutamento leucocitario. Oltre a questi segnali, finalizzati alla migrazione cellulare, vengono anche attivate cascate chinasiche intracellulari della famiglia delle chinasi da stress JNK, ERK1/2, p38, che agendo in particolare su fattori trascrizionali della famiglia di NF- κ B e AP-1 regolano la trascrizione genica.

Una seconda classe di recettori, definiti "atipici", è strutturalmente analoga alla precedente ma è incapace di mediare attivazione di proteine G eterotrimeriche a seguito dell'ingaggio recettoriale e, come conseguenza, non media la migrazione cellulare. Questi recettori sono invece coinvolti nel definire la distribuzione spaziotemporale del ligando, attraverso il suo trasporto o la sua degradazione. Dati indiretti indicano che questa classe di recettori, inizialmente definiti "silenti" in quanto ritenuti incapaci di segnalare, è viceversa accoppiata a differenti vie di segnalazione, probabilmente coinvolgenti arrestina.

L'attivazione dei recettori chemochinici convenzionali li rende anche target di una specifica famiglia di chinasi, le GRK, che ne fosforilano i residui serino-treoninici nella coda C-terminale. I residui fosfoserinici e fosfotreoninici agiscono quali siti di ancoraggio dell'adattatore citoplasmatico β arrestina, che ancorandosi selettivamente al recettore fosforilato causa da un lato l'arresto della trasduzione del segnale G protein-dipendente e dall'altro media l'internalizzazione del recettore attraverso un meccanismo controllato da vescicole ricoperte di clatrina. Tramite questa via di internalizzazione il recettore è quindi veicolato in compartimenti acidi intracellulari, in cui il ligando viene rilasciato e degradato, mentre il recettore è defosforilato a opera di specifiche fosfatasi e riciclato in membrana (vedi anche Capitolo 6). Diversamente dai recettori convenzionali, i recettori atipici sembrano caratterizzati da una costitutiva associazione a β arrestina. Questo fatto ne influenza profondamente i pathway di ricircolo intracellulare ed è alla base del differente ruolo biologico di questa classe recettoriale.

Le citochine nel contesto biologico

Una classificazione basata su caratteristiche strutturali delle citochine e dei loro recettori come quella presentata è intuitivamente inadatta a fornire informazioni funzionali. D'altra parte una trattazione dettagliata delle proprietà funzionali dei singoli mediatori è operazione difficilmente effettuabile, e certamente al di là degli obiettivi di questo testo. Viene quindi proposta la descrizione delle attività biologiche di differenti mediatori raggruppati e descritti in funzione dei principali processi biologici in cui sono coinvolti. Si tratta intuitivamente di una classificazione non rigidamente definita e parziale, che deve essere intesa solo come orientamento generale, anche in considerazione del fatto che molte citochine sono in effetti coinvolte in differenti processi biologici.

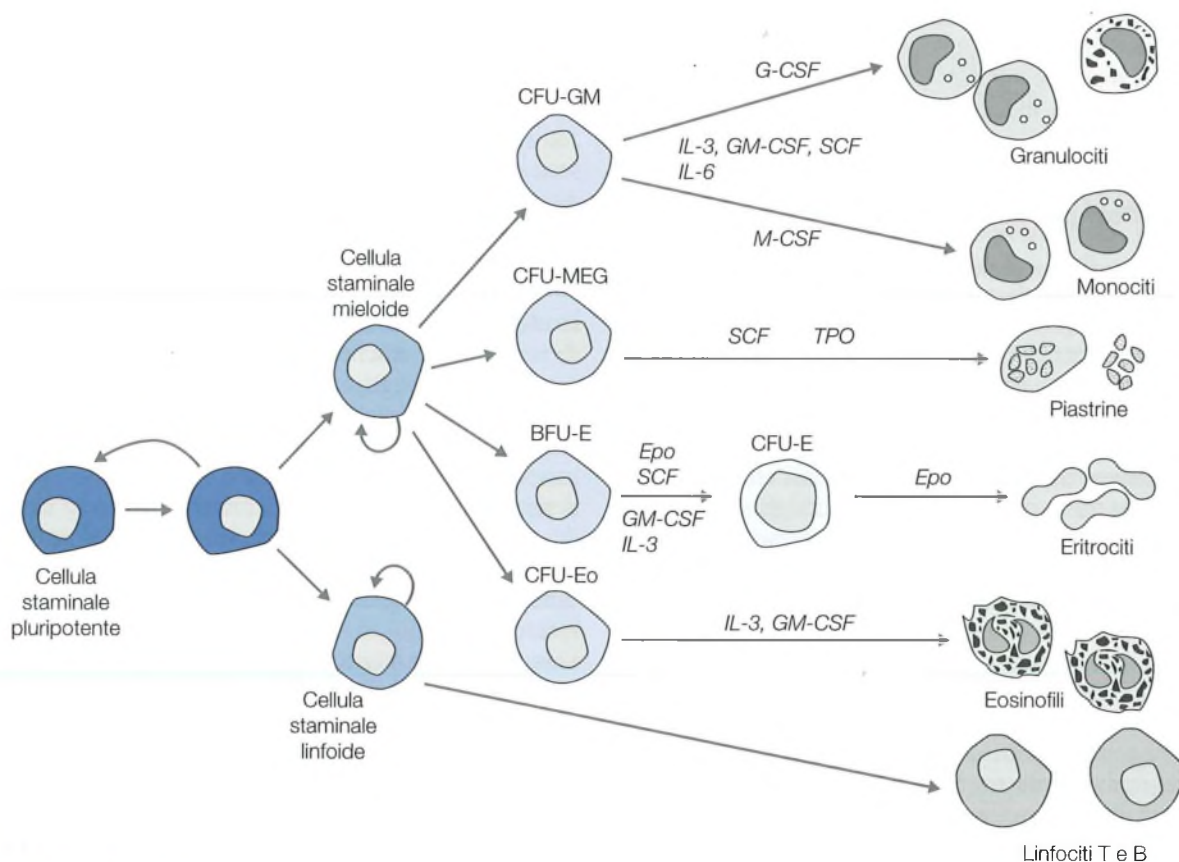


FIGURA 15.2 Ruolo delle citochine nell'ematopoiesi. Il processo ematopoietico è responsabile della produzione di differenti lineage cellulari a partire dalla cellula staminale multipotente, che va incontro da un lato a un processo di *self-renewal* e dall'altro a un progressivo differenziamento verso i differenti tipi cellulari. Questo processo è strettamente controllato da differenti fattori stimolanti le colonie (CSF), che supportano la differenziazione dei precursori verso i differenti lineage cellulari.

Citochine ematopoietiche

Le citochine ematopoietiche garantiscono la produzione omeostatica di cellule e la loro attivazione in condizioni di emergenza

Il sistema ematopoietico produce 8 differenti lineage cellulari ematici, costituiti da cellule terminalmente differenziate derivate da un piccolo pool di cellule staminali comuni attraverso una serie di precursori progressivamente differenziati. Questo processo non solo garantisce la produzione quotidiana di milioni di cellule per il mantenimento delle condizioni omeostatiche, ma fornisce anche risposte "di emergenza" in condizioni patologiche, normalmente con una rapida e massiccia espansione coordinata di più lineage. Il controllo di questo processo coinvolge segnali derivati dai contatti intercellulari, in particolare tra le cellule della matrice stromale midollare e i precursori ematopoietici, e segnali solubili, in gran parte prodotti nel microambiente midollare e attivi in modo paracrino. Quest'ultimo gruppo di mediatori include oltre 20 citochine, nella gran parte dei casi coinvolte nel controllo di differenti lineage (ridondanza), frequentemente in modo sinergico, garantendo quindi elevata efficienza. In effetti, la gran parte dei

mediatori ha attività preferenziale su uno o pochi lineage, ma è in grado di agire sulla gran parte dei lineage in azione sinergica con altri mediatori (Figura 15.2). La gran parte di queste molecole appartiene alla famiglia delle emopoietine, la cui principale attività è appunto il controllo dell'ematopoiesi. Tuttavia molte di queste molecole possiedono attività biologiche anche in altri contesti biologici, in particolare regolando la funzione delle popolazioni leucocitarie mature di cui controllano anche la produzione, come nel caso del controllo della sopravvivenza e delle risposte funzionali di granulociti neutrofili a opera di GM-CSF e G-CSF. Oltre ai CSF, appartengono a questo gruppo funzionale eritropoietina (selettiva per il lineage eritroide), trombopoietina (il principale regolatore della trombopoiesi), IL-3 (che ha funzione di multi-CSF), IL-5 (CSF per il lineage dei granulociti eosinofili), IL-7 (CSF specifico per cellule linfoidi), e stem cell factor. Inoltre anche citochine primariamente coinvolte in processi biologici differenti controllano alcuni aspetti dell'ematopoiesi, come nel caso delle citochine proinfiammatorie primarie IL-1 e IL-6 che stimolano i progenitori, o delle chemochine CCL3 e CXCL8 e degli interferoni che li inibiscono. La capacità dei CSF di coordinare l'ematopoiesi ha dato

vita a partire dalla fine degli anni 80 a un crescente interesse per il potenziale utilizzo di questa classe di molecole in ambito terapeutico. Dopo averne dimostrato la sostanziale mancanza di effetti collaterali importanti, il loro uso è entrato nella pratica clinica. In un primo periodo i CSF sono stati utilizzati prevalentemente nel caso di una caduta nel numero di granulociti neutrofili, determinata da condizioni patologiche o iatrogene, al fine di ridurre il rischio di sviluppo di patologie infettive opportunistiche. In particolare, somministrati per via parenterale in protocolli di supporto successivi a trattamenti chemioterapici, GM-CSF e G-CSF ricombinanti si sono dimostrati in grado di ridurre il nadir conseguente agli effetti citotossici del chemioterapico e di accelerare il recupero di una normale conta leucocitaria, riducendo il numero e la gravità di sovrainfezioni. Nel corso dello svolgimento di questi protocolli clinici, inoltre, si è osservato un inatteso effetto di mobilitazione dal midollo di precursori ematopoietici. Attualmente l'uso di CSF come mobilizzatori midollari rappresenta il principale utilizzo di queste citochine in ambito clinico, sia in protocolli trasfusionali classici, sia in terapie di supporto a protocolli con chemioterapici ad alte dosi.

Citochine dell'immunità innata

La risposta infiammatoria è indotta e controllata da un ampio pannello di mediatori citochinici che agiscono nel contesto di un complesso network

Le citochine coinvolte nel controllo della risposta infiammatoria si possono classificare in citochine infiammatorie primarie, rappresentate da IL-1, TNF α e IL-6, molecole prodotte e rilasciate localmente dall'avvio al processo, e in citochine infiammatorie secondarie, rappresentate dalle chemochine, indotte dalle precedenti e responsabili del processo di reclutamento leucocitario. In generale, le citochine infiammatorie primarie sono estremamente pleiotropiche, nel senso che il loro spettro di azione comprende una grande varietà di cellule e di tessuti. Infatti molecole come IL-1 e TNF α agiscono praticamente su tutte le cellule e su tutti i tessuti dell'organismo. Inoltre, nonostante il fatto che queste molecole interagiscono con recettori strutturalmente diversi, le loro attività si sovrappongono in modo importante. IL-1 e TNF α sono in modo inequivocabile citochine infiammatorie primarie, nel senso che hanno la capacità di mettere in movimento l'intera cascata di mediatori caratteristici di una risposta infiammatoria. IL-6 tende a essere in una certa misura un mediatore secondario, nel senso che costituisce la molecola responsabile per risposte quali la produzione di proteine di fase acuta. IL-1 è in realtà un sistema complesso costituito da 11 membri. Le due molecole agoniste meglio caratterizzate, IL-1 α e IL-1 β , hanno attività simili e interagiscono con gli stessi recettori benché dal punto di vista strutturale abbiano una omologia di sequenza solo di circa il 20%. È da tempo noto inoltre un antagonista recettoriale, IL-1ra, selettivamente indotto nelle stesse cellule che producono IL-1 da citochine antinfiammato-

rie, che lega il recettore, non dà alcuna risposta biologica e impedisce alle molecole agoniste di interagire con il recettore, analogamente a IL-1F5 e IL-1F7, che sembrano agire come inibitori non specifici della risposta infiammatoria. Inoltre appartengono alla famiglia di IL-1 anche citochine coinvolte nella polarizzazione della risposta immunitaria specifica, tra cui IL-18, importante nella regolazione delle risposte immunitarie specifiche di tipo Th1, e IL-1F11, anche indicata come IL-33, che attraverso il recettore ST2 svolge un ruolo nella regolazione dei mastociti nelle risposte allergiche coordinate dai Th2. Infine è interessante notare che IL-33 e IL-1F7 sono citochine intracellulari e svolgono alcune attività biologiche anche attraverso il legame al DNA nucleare. Molte delle citochine del sistema IL-vengono sintetizzate come pro-peptidi e vengono a processate all'interno della cellula a una forma matura da un enzima detto caspasi-1 o *IL-1 Converting Enzyme* (ICE) e successivamente secrete. L'attivazione di ICE è a sua volta sottoposta a regolazione attraverso il controllo dell'assemblaggio di un complesso multimerico ad attività proteolitica noto come infiammossoma (vedi anche Capitolo 47).

Come IL-1, TNF α è un mediatore centrale delle risposte infiammatorie. Sintetizzato anch'esso come precursore espresso come proteina transmembrana di tipo II, viene rilasciato nella forma solubile presente nei liquidi biologici per azione di una metalloproteasi detta *TNF α -Converting Enzyme* (TACE). Sia la forma di membrana di TNF α che la forma solubile sono capaci di interagire con i recettori e quindi di attivare risposte biologiche.

Sia TNF α che IL-1 sono prodotte da una varietà di tipi cellulari, macrofagi in particolare, in risposta a una varietà di stimoli pro-infiammatori, in particolare prodotti microbici ligandi dei recettori della famiglia TLR. Inoltre le stesse IL-1 e TNF α danno vita un circuito di autoamplificazione. Da un punto di vista biologico, IL-1 e TNF α condividono buona parte degli effetti biologici e presentano un profilo d'azione estremamente ampio, essendo in grado di agire praticamente su tutte le cellule e i tessuti dell'organismo. A livello locale, nel tessuto sede di infiammazione, uno dei bersagli principali è costituito dalle cellule dell'albero vascolare, in cui inducono un programma genico proinfiammatorio e pro-trombotico. IL-1 e TNF α inducono infatti la produzione di chemochine e di molecole di adesione, amplificando il reclutamento di cellule infiammatorie a livello locale. Inoltre inducono l'espressione di enzimi che portano alla sintesi di prostaciclina e di monossido di azoto, che hanno attività vasodilatatoria. Infine, modificano profondamente le proprietà anticoagulanti dell'endotelio vascolare, inducendo la produzione del tissue factor, che ha attività procoagulante, e inibendo l'asse anticoagulante costituito dalla proteina C e dalla trombomodulina. Un secondo bersaglio è rappresentato dai tessuti connettivi, in particolare le cellule del tessuto osseo, cartilagineo, e della sinovia. In queste cellule IL-1 e TNF α inducono la produzione di proteasi e di prostaglandine, che causano dissoluzione e danno del tessuto e fenomeni quali il riassorbimento osseo osservato in molte condizioni

patologiche. Da ultimo a livello locale IL-1 e TNF α rappresentano i principali attivatori dei fagociti infiltranti, di cui potenziano le attività citotossiche e migliorano la sopravvivenza.

Oltre agli effetti locali, IL-1 e TNF α possiedono anche importanti effetti a distanza. Tuttavia, diversamente dagli effetti locali in larga parte condivisi, le citochine infiammatorie differiscono nelle attività a distanza, frequentemente determinate in realtà dall'induzione di mediatori secondari. Nel compartimento emopoietico IL-1 induce la stimolazione della proliferazione e della differenziazione dei precursori emopoietici, in larga parte mediante la produzione di fattori di crescita (GM-CSF in particolare) e IL-6. Nello stesso compartimento TNF ha effetti tendenzialmente opposti, mediando inibizione dei precursori emopoietici. Questo effetto è probabilmente responsabile dell'anemia associata a patologie croniche con iperproduzione di TNF α .

Un secondo importante organo bersaglio a distanza è rappresentato dal sistema nervoso centrale. IL-1 in particolare agisce come un potente pirogeno endogeno, anche se l'effetto pirogenico di IL-1 è indiretto essendo mediato dall'induzione a livello dei centri ipotalamici di IL-6 e prostaglandine, che costituiscono i mediatori ultimi dell'effetto pirogenico. Sempre a livello del sistema nervoso centrale, IL-1 e TNF α condividono invece la capacità di indurre anoressia e astenia, componenti

evidenti della risposta infiammatoria sistemica, e agendo sui centri ipotalamici inducono la produzione di ACTH. ACTH induce la produzione dal surrene di ormoni glucocorticoidi, che intervengono nei processi di spegnimento della risposta infiammatoria (vedi anche Capitoli 45 e 47) (Figura 15.3). L'attivazione quindi dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene costituisce un'ansa di feedback negativo dell'attività proinfiammatoria delle citochine primarie dell'infiammazione. Infine il fegato rappresenta un importante organo bersaglio coinvolto nella risposta di fase acuta che accompagna quadri infiammatori importanti. A livello epatico IL-1 induce la produzione di proteine di fase acuta, che amplificano a livello sistemico i meccanismi dell'immunità innata e del rimodellamento tessutale. L'induzione di proteine di fase acuta è in larga misura un effetto indiretto, in quanto il mediatore ultimo responsabile di questo effetto è IL-6.

IL-6 non ha solo un ruolo centrale nell'induzione della risposta di fase acuta, ma in generale ha una funzione di effettore ultimo di molti degli effetti sistemici di IL-1 e TNF α , tra cui gli effetti sul sistema nervoso centrale e sul compartimento emopoietico. Quest'ultima attività è importante in particolare in alcune patologie neoplastiche, quali il mieloma multiplo. Come già detto, IL-6 interagisce con un recettore costituito da due catene, la catena gp130 è comune a recettori che riconoscono altre citochine, e la catena specifica IL-6R α . Esiste una

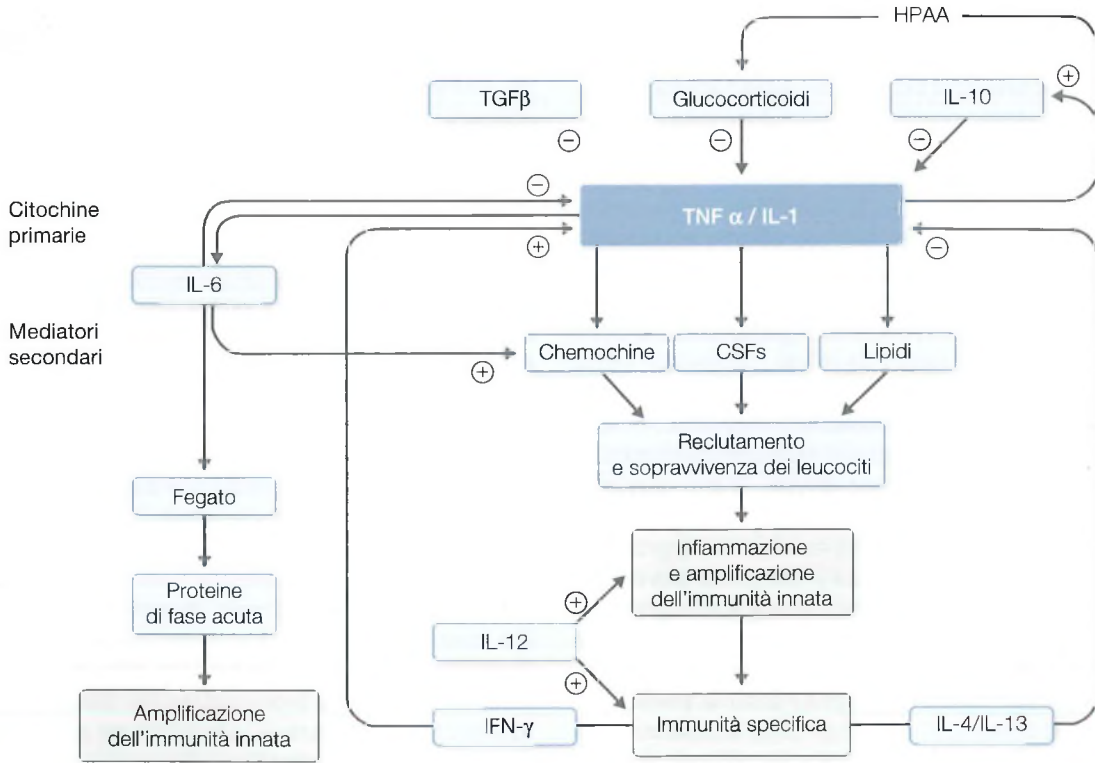


FIGURA 15.3 Cascata delle citochine infiammatorie. Le citochine infiammatorie attivano e sostengono la risposta infiammatoria e immunitaria innata, e sono classicamente distinte in citochine infiammatorie primarie, prototipi delle quali sono IL-1, TNF α , e IL-6, che agendo sul fegato attivano la risposta di fase acuta, e secondarie, le chemochine, che amplificano il reclutamento dei globuli bianchi e la loro sopravvivenza nei tessuti e preparano lo scenario per l'attivazione dell'immunità specifica. La cascata delle citochine infiammatorie è regolata da segnali negativi, in parte rappresentati dagli ormoni glucocorticoidi derivati dall'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, e in parte da citochine antinfiammatorie quali IL-10 e TGF β . HPAA: *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis*, asse ipotalamo-ipofisi-surrene.

variante solubile di IL-6R α che interagisce con il ligando e formare un complesso IL-6/IL-6R α in forma solubile. Questo complesso, presente nei liquidi biologici, è in grado di interagire con la catena segnalante gp130 e, attraverso un meccanismo detto di transsignalling, fa sì che possano rispondere a IL-6 cellule quali le cellule endoteliali che esprimono gp130 ma non la catena IL-6R α . Sull'endotelio vascolare IL-6 amplifica l'espressione di molecole adesive e, favorendo la produzione di chemochine attive su monociti rispetto a chemochine attive su neutrofilo, contribuisce alla transizione dalla infiammazione acuta all'infiammazione cronica.

In generale, quindi, le citochine infiammatorie primarie IL-1 e TNF α , a livello locale, inducono la produzione di molecole adesive, chemochine, fattori di crescita e mediatori solubili, che amplificano il reclutamento leucocitario e la sopravvivenza dei leucociti reclutati nel tessuto (Figura 15.3). L'aumento di leucociti a livello locale amplifica localmente i meccanismi dell'immunità innata e pone le basi per l'attivazione dell'immunità specifica, in particolare grazie a molecole quali IL-12, e per orientare l'immunità specifica a polarizzarsi in risposte di tipo I, caratterizzate dalla produzione di IFN- γ , o in risposte di tipo II caratterizzate dalla produzione di IL-14 e IL-13 (vedi oltre). A distanza, IL-1 e TNF α agiscono su compartimento ematopoietico, sistema nervoso centrale e fegato, in gran parte attraverso IL-6, determinando complessivamente gli effetti sistemici della risposta infiammatoria. Nello sviluppo della risposta infiammatoria, un aspetto fondamentale è svolto dal reclutamento di leucociti dal torrente ematico nel tessuto sede del danno. Una superfamiglia di citochine specificamente coinvolta nel controllo di questo processo è rappresentata dalle chemochine, o citochine infiammatorie secondarie. Questa superfamiglia include circa 50 proteine di basso peso molecolare (8-10 kDa) con caratteristiche strutturali comuni (discusse in precedenza), che attivano una famiglia distinta di recettori a sette domini transmembrana ed esercitano attività chemiotattica verso differenti popolazioni leucocitarie. La posizione relativa dei residui cisteinici presenti nella struttura di queste molecole ne consente una sottoclassificazione in 4 famiglie. La prima famiglia include 16 molecole in cui la coppia di residui cisteinici nella porzione amminoterminale è intervallata da un residuo amminoacidico variabile (chemochine CXCL). Questa famiglia è ulteriormente suddivisa in base alla presenza o meno nella porzione amminoterminale della sequenza ELR. Le chemochine CXC ELR-positive sono proteine assenti in condizioni omeostatiche ma fortemente indotte da stimoli infiammatori, sia endogeni, quali le citochine proinfiammatorie primarie, che esogeni, derivati direttamente dal patogeno. Interagiscono con i recettori CXCR1 e CXCR2, e sono essenziali per il reclutamento di granulociti neutrofilo nelle fasi iniziali della risposta infiammatoria. Le chemochine CXC ELR-negative attivano i recettori CXCR3, 4 e 5, e non hanno un ruolo nella risposta infiammatoria acuta ma in altri processi quali le forme croniche di tipo I (gli agonisti di CXCR3), l'omeostasi del compartimento ematopoietico

(gli agonisti di CXCR4), e il reclutamento di cellule B (gli agonisti di CXCR5). La seconda famiglia include 27 proteine in cui i due residui cisteinici amminoterminali sono adiacenti (chemochine CCL). Molte di queste molecole sono inducibili e sono coinvolte nel reclutamento di monociti e linfociti nelle fasi avanzate della risposta infiammatoria, mediante attivazione dei recettori CCR1, 2, 3, 4, 5 e 8. Alcune hanno un ruolo preponderante nell'attivazione della risposta immunitaria specifica, quali gli agonisti di CCR7 che controllano il trasferimento di cellule dendritiche dalla periferia al linfonodo drenante, o nel selettivo reclutamento di linfociti T helper di tipo 1 (agonisti di CCR5) o di tipo 2 (agonisti di CCR3, 4 e 8). L'unico rappresentante della terza famiglia, in cui 3 residui amminoacidici separano la coppia cisteinica, chiamato CX3CL1, recluta cellule NK, mentre il solo rappresentante della quarta famiglia, che presenta un solo residuo cisteinico amminoterminale, chiamato XCL1, recluta linfociti T. Queste citochine sono essenzialmente molecole ad azione chemiotattica. Tuttavia, nel contesto complesso di una risposta infiammatoria e in sinergismo con citochine infiammatorie primarie, sono anche in grado di attivare nella cellula bersaglio altre risposte, quali l'attivazione di meccanismi citotossici nei fagociti o la polarizzazione della risposta immune specifica.

Citochine dell'immunità acquisita

La proliferazione e la differenziazione di linfociti T e B sono controllate da un ampio pannello di citochine che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta immune specifica

Lo studio della regolazione della proliferazione linfocitaria ha portato nel 1975 alla identificazione quale TCGF (*T Cell Growth Factor*) di IL-2. Nei linfociti T l'interazione con l'antigene porta all'attivazione del fattore nucleare delle cellule T attivate (NFAT), un fattore trascrizionale la cui attivazione transattiva il gene per IL-2 e della catena α del recettore. Il trascritto di IL-2 è tuttavia caratterizzato da una breve emivita determinata dalla presenza di segnali di instabilità nella porzione 3' UTR, come frequentemente si osserva per molte citochine, e non si osserva una significativa produzione di IL-2 né proliferazione linfocitaria, ma anergizzazione del linfocita. Solo la presenza di segnali intracellulari derivati da molecole costimolatorie determina un'ulteriore transattivazione del messaggero di IL-2 a opera di altri fattori trascrizionali e la stabilizzazione del messaggero, portando alla produzione e secrezione di IL-2 e alla conseguente proliferazione linfocitaria. L'importanza di IL-2 nella risposta immunitaria acquisita è sottolineata dal fatto che i principali farmaci immunosoppressivi mediano i propri effetti proprio attraverso la soppressione della trascrizione del gene di IL-2. Dopo interazione con una famiglia di partner intracellulari dette immunofiline, sia ciclosporina A che FK-506 determinano infatti l'inibizione della fosfatasi citosolica calcineurina, che defosforilando NFAT ne consentirebbe in condizioni

normali la traslocazione nucleare, portando in ultima analisi alla produzione di IL-2. Anche la differenziazione dei linfociti T CD4+ a funzione helper conseguente all'esposizione all'antigene è un processo principalmente sottoposto al controllo di un ampio numero di citochine (Figura 15.4). In particolare, mentre IL-12, prodotta selettivamente da macrofagi attivati, e IFN- γ , prodotto dagli stessi Th1 e da cellule NK, promuovono la differenziazione verso Th1 e inibiscono la differenziazione a Th2, IL-4, IL-5 e IL-13, prodotte selettivamente da linfociti Th2, svolgono la funzione opposta. Quindi non solo la differenziazione è controllata dal contesto citochinico, ma la classificazione stessa delle due popolazioni linfocitarie Th1 e Th2 è basata sulla capacità di produrre profili distinti di citochine. La polarizzazione linfocitaria ha un ruolo centrale nel determinare il tipo di risposta immunitaria attivata in risposta all'esposizione all'antigene, in quanto determina l'attivazione di differenti effettori leucocitari. In particolare, una risposta coordinata da Th1, essenzialmente attraverso IFN- γ , determina una forma di attivazione macrofagica "classica", con potenziamento delle risposte citotossiche cellulo-mediate, particolarmente adatte per l'eradicazione di patogeni intracellulari. Viceversa una risposta coordinata da Th2, attraverso la produzione di IL-4 e IL-5, determina una differente forma di attivazione macrofagica detta "alternativa", che assieme all'eosinofilo, supporta una risposta umorale anticorpo-mediata, particolarmente adatta alla eradicazione dei patogeni extracellulari. In un contesto patologico, la caratterizzazione del contesto citochinico dominante consente la classificazione di differenti patologie alla luce del para-

digma Th1/Th2. Così mentre patologie allergiche quali l'asma estrinseco o la rinite allergica sono chiaramente dominati da un quadro Th2, in molte patologie autoimmuni, tra cui l'artite reumatoide, il diabete di tipo I e la sclerosi multipla, domina un quadro Th1. Questo tipo di classificazione rende conto dell'uso di alcune citochine in ambito terapeutico, quale ad esempio il trattamento con IFN- γ nella sindrome di Omenn, una immunodeficienza primitiva associata a un profilo Th2, e delle speranze di riposte nei tentativi di ridirezionare la risposta immunitaria per il trattamento di alcune patologie, in particolare quelle di tipo allergico.

Citochine antinfiammatorie e immunosoppressive

La regolazione negativa della risposta immunitaria è determinata dall'attivazione di specifici sistemi citochinici

In generale le citochine operano all'interno di circuiti complessi, in cui differenti mediatori si potenziano o si inibiscono reciprocamente, e frequentemente citochine il cui ruolo primario è rappresentato dall'attivazione di alcune forme di risposta immunitaria ne sopprimono altre. È il caso ad esempio di IL-6 che, pur avendo un ruolo primario nella reazione di fase acuta e nell'attivazione di linfociti B nella risposta immunitaria specifica, ha alcuni effetti antinfiammatori su cellule fagocitiche, o di IL-4 e IL-13 che come detto coordinando una risposta immunitaria specifica di tipo II si oppongono agli effetti di IFN- γ , tra cui l'attivazione di meccanismi di citotossi-

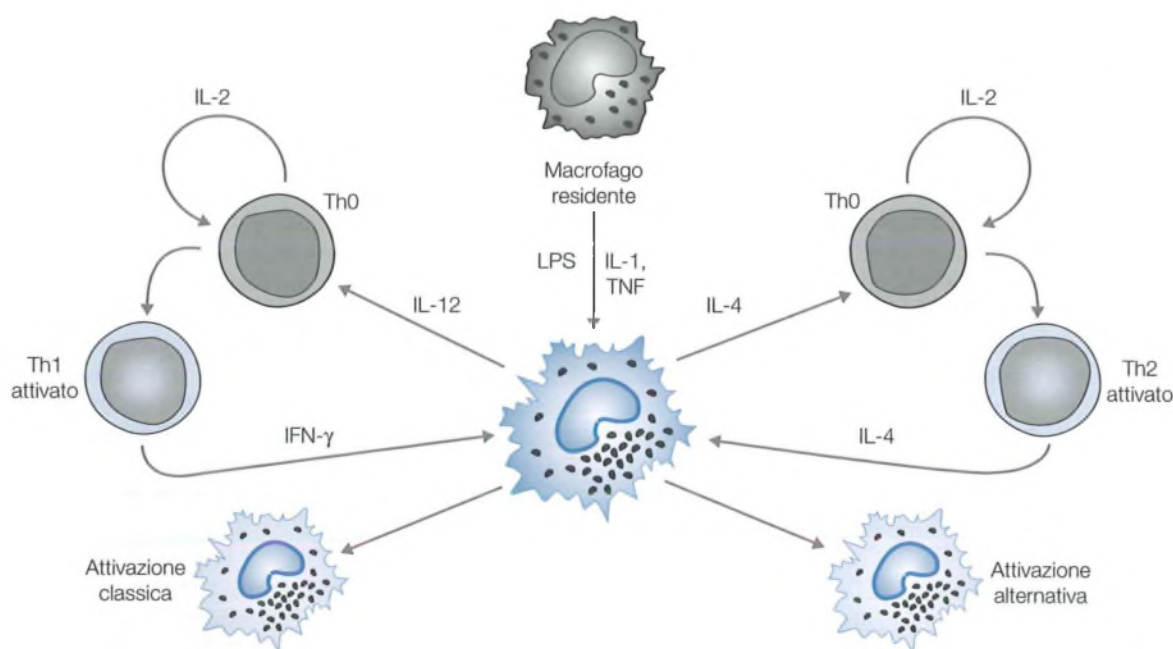


FIGURA 15.4 Ruolo delle citochine dell'immunità acquisita nella polarizzazione della risposta immunitaria. L'interazione di cellule fagocitiche con il patogeno determina il contesto citochinico e la conseguente polarizzazione della risposta immunitaria specifica. I linfociti Th polarizzano quindi la risposta infiammatoria mediante la produzione di differenti citochine, tra cui un ruolo primario è svolto da IFN- γ per la polarizzazione di tipo I e IL-4 per la polarizzazione di tipo II.

cità macrofagica. Tuttavia esistono alcune citochine il cui compito primario è rappresentato dall'attivazione di circuiti di feed-back negativo. Un esempio di questo gruppo di modulatori negativi è rappresentato da IL-10 (Figura 15.5). Questa citochina è prodotta dalle stesse cellule e in risposta agli stessi stimoli che inducono produzione dei principali mediatori proinfiammatori, quali IL-1 e TNF α , ma in una fase temporale successiva. La principale funzione consiste nella inibizione della cascata citochinica proinfiammatoria, in parte mediante inibizione della produzione di IL-1 e TNF α (attraverso meccanismi di tipo sia pre-trascrizionali attivi sull'attivazione dei fattori trascrizionali NF- κ B e STAT5, che post-trascrizionali che interferiscono con i processi di stabilizzazione del messaggero di citochine infiammatorie), in parte mediante l'induzione della produzione di altre citochine antinfiammatorie, quali IL-1ra. È interessante notare che molti xenobiotici ad attività antinfiammatoria, tra cui i farmaci cortisonici, svolgono la propria azione anche attraverso l'induzione di IL-1.

Farmacologia delle citochine e dei loro recettori

In qualità di mediatori solubili le citochine sono dunque in grado di sviluppare un numero impressionante di attività biologiche. In alcuni casi alcune molecole sono state adottate nel repertorio farmacologico proprio in funzione delle attività che svolgono (è il caso ad esempio dei CSF nella terapia di supporto a protocolli chemioterapici o trasfusionali), ma nella gran parte dei casi gli sforzi dei ricercatori sono stati indirizzati a strategie atte a inibirne le attività. La recente caratterizzazione molecolare dei recettori in particolare ha dato avvio a sforzi volti all'identificazione di antagonisti recettoriali, un approccio già perseguito con successo in altri ambiti farmacologici. Tuttavia, mentre l'interesse futuro è pri-

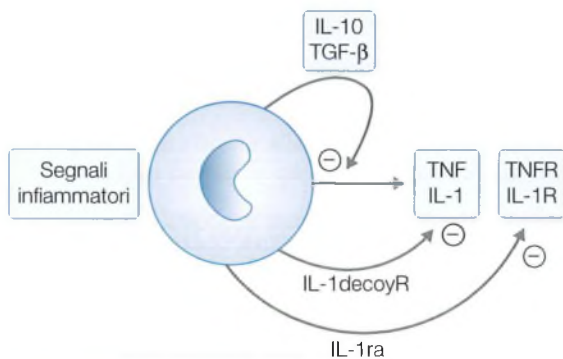


FIGURA 15.5 Circuiti di regolazione negativa delle citochine primarie dell'infiammazione. La risposta infiammatoria, coordinata dalle citochine proinfiammatorie primarie IL-1, TNF e IL-6, è strettamente controllata da citochine antinfiammatorie, tra cui IL-10 e TGF- β , che controllano lo sviluppo della risposta infiammatoria inibendo da un lato la produzione delle citochine proinfiammatorie e dall'altro inducendo molecole inibitorie, tra cui il recettore antagonista e il recettore decoy di IL-1.

mariamente indirizzato alla identificazione di molecole con funzione di inibitori recettoriali e/o del signalling, con caratteristiche ideali per lo sviluppo farmacologico (basso peso molecolare, natura non peptidica, attive per via orale), in effetti i maggiori successi per ora sono stati ottenuti utilizzando molecole ricombinanti, come nel caso degli interferoni, dei CSF midollari o di IL-1ra, dotate di buona attività ma poco adatte allo sviluppo farmacologico. I buoni risultati ottenuti con questo tipo di molecole indicano quindi che questa linea di ricerca ha promettenti margini di sviluppo, ma ha anche la necessità di approfondire le conoscenze molecolari delle strutture recettoriali e di trasduzione del segnale coinvolte (vedi anche Capitolo 17).

Inibitori recettoriali

Nonostante l'identificazione molecolare e spesso anche la caratterizzazione strutturale mediante cristallografia di molti recettori per citochine, non esistono ancora a oggi inibitori recettoriali per la gran parte delle citochine descritte. L'unica eccezione in questo scenario è rappresentata dalle chemochine. Due elementi hanno contribuito a questo risultato. Il primo è che, come detto, i recettori appartengono alla superfamiglia dei recettori a sette domini transmembrana, una tipologia di recettore ben nota alla farmacologia moderna. Il secondo è stato il riconoscimento di un ruolo irrinunciabile di recettori per chemochine nel processo di infezione di HIV, che ha improvvisamente determinato notevoli sforzi volti a identificare bloccanti recettoriali. Partendo da banche di composti, molte industrie hanno recentemente identificato molecole in grado di bloccare con buona specificità e selettività un numero significativo di questa famiglia di recettori. Nel 2009 sono infine stati approvati i primi due farmaci attivi su recettori per chemochine, un inibitore di CCR5 indicato nella terapia dell'HIV che colpisce in particolare i recettori coinvolti nell'infezione di HIV (CCR5 e CXCR4) e i recettori CCR e CXCR coinvolti nella risposta infiammatoria.

Inibitori della trasduzione del segnale

Come detto, nella gran parte dei casi differenti citochine mediano effetti analoghi, in un sistema fortemente ridondante, come chiaramente illustrato ad esempio nel caso di citochine infiammatorie sia primarie che secondarie. Questa considerazione rende concettualmente interessante il targeting di molecole coinvolte nei processi di trasduzione del segnale, che sono spesso condivise e attualmente sufficientemente caratterizzate, almeno per alcune classi di mediatori. Tuttavia l'unico esempio di questo approccio è rappresentato dal già ricordato blocco del sistema di IL-2 a opera dei farmaci immunosoppressori, in cui però in effetti è stato lo studio del meccanismo d'azione dei farmaci a fornire informazioni sulle vie di trasduzione del segnale, e non viceversa. Sono attualmente in fase di studio molecole mirate direttamente all'inibizione di fattori trascrizionali con un'attività

centrale per la risposta infiammatoria, quali NF- κ B, o molecole in grado di agire sulle cascate chinasiche che ne determinano l'attivazione, quali le chinasi da stress (JNK, ERK1/2, p38).

Modulatori della produzione di citochine

In assenza di strumenti farmacologici in grado di bloccare selettivamente l'azione di differenti citochine, è stato frequentemente utilizzato un approccio alternativo mirato a controllarne la produzione. Il migliore esempio del successo di questa strategia è probabilmente rappresentato dall'uso di farmaci corticosteroidi nel controllo della risposta infiammatoria. Mimando l'azione degli ormoni glucocorticoidi, queste molecole intervengono nei circuiti di regolazione e si sono dimostrati in grado di inibire la sintesi delle principali citochine proinfiammatorie primarie e secondarie (incluse IL-1, TNF α , IL-6, e le chemochine CCL2, CXCL8), nonché citochine dell'immunità innata quali IFN- γ e IL-4. Il meccanismo d'azione di questi agenti farmacologici è complesso, ma almeno relativamente all'inibizione della sintesi di IL-1 e TNF α sono stati dimostrati effetti a livello sia trascrizionale (sull'attivazione di NF- κ B) che post-trascrizionale (stabilità del messaggero). All'attività antinfiammatoria dei glucocorticoidi contribuiscono, inoltre, l'induzione di molecole endogene coinvolte nei circuiti di regola-

zione negativa della risposta infiammatoria, quali IL-10, IL-1ra e il recettore decoy IL-1 R di tipo II. Almeno una parte delle attività descritte per glucocorticoidi è inoltre condivisa da vitamina A, che agendo su recettori nucleari dell'acido retinico blocca la produzione di IL-6, e vitamina D, che inibisce la produzione di IL-1 e IL-12 nei macrofagi. Uno dei limiti più rilevanti di questo tipo di approccio è la mancanza di selettività d'azione. Più recentemente l'inibizione selettiva di un determinato mediatore (la chemochina CXCL8 nel caso specifico) è stata utilizzata con successo, almeno in modelli animali, oligonucleotidi antisense.

Anticorpi terapeutici contro citochine e loro recettori

La dimostrazione alla metà degli anni 80 dell'efficacia terapeutica di anticorpi bloccanti diretti contro TNF α in patologie immunomediate ha dato avvio a un notevole sviluppo di linee di ricerca orientate a bloccare mediatori della risposta infiammatoria attraverso antagonisti recettoriali, quali IL-1ra, versioni solubili dei recettori di membrana, come nel caso di TNF e IL-6, o anticorpi bloccanti, che rappresentano l'approccio di gran lunga di maggior successo con oltre 25 molecole sul mercato e circa 250 in fase di sviluppo. Questo tipo di approccio è discusso in dettaglio nei Capitoli 17 e 47.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Le citochine rappresentano un complesso sistema di mediatori solubili controllati da network molecolari.
- ▶ Le fasi salienti della risposta immunitaria innata e adattativa sono controllate da varie classi di citochine specializzate in differenti processi biologici.
- ▶ Esistono vari approcci farmacologici che operano un controllo sul sistema citochinico, attivi sulla produzione o sulla rimozione dei ligandi o sull'attivazione recettoriale e sulla cascata di trasduzione del segnale.

Bibliografia essenziale

- ▶ Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokines: Receptors, structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007;25:787-820.
- ▶ Charo IF, Ransohoff MD. The many roles of chemokines and receptors in inflammation. *New Eng J Med* 2006;354:610-9.
- ▶ Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the Interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-50.
- ▶ Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 2006;6:907-18.
- ▶ Mantovani A, Dinarello CA, Ghezzi P. *Pharmacology of cytokines*. London: Oxford University Press, 2000.
- ▶ Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009;27:451-83.
- ▶ Thomson A. *The cytokine handbook*. IV ed. San Diego: Academic Press, 2001.
- ▶ Un elenco analitico delle principali citochine, con informazioni strutturali e funzionali può essere consultato in: *Cancer Medicine*, V edition. Section 16: Principles of biotherapeutics, disponibile on line al sito www.ncbi.nlm.nih.gov nella sezione "book".

I recettori che mediano l'adesione cellulare

CAPITOLO

16

Giorgio Berton, Carlo Laudanna

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le informazioni relative ai meccanismi molecolari di attivazione delle molecole di adesione
- ▶ Comprendere i meccanismi molecolari mediante i quali molecole di adesione trasducono il segnale regolando proliferazione e sopravvivenza cellulare
- ▶ Conoscere i principali fenomeni fisiologici e patologici regolati da interazioni adesive

L'esistenza di meccanismi in grado di mediare l'adesione di cellule tra di loro o a componenti del tessuto connettivo (matrice extracellulare) rappresenta una caratteristica essenziale di tutti gli organismi multicellulari. Inoltre, negli organismi dotati di un sistema circolatorio, fenomeni adesivi sono implicati nel controllo della migrazione di cellule dal circolo ai tessuti e della riparazione di danni interessanti strutture vascolari. Le ricerche sui meccanismi responsabili dell'adesione sono state per molto tempo orientate alla caratterizzazione delle molecole implicate in questo fenomeno. Più recentemente è emerso che tali molecole, analogamente ad altri recettori di superficie, trasmettono segnali all'interno della cellula regolando il movimento, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, la trascrizione genica.

I recettori di adesione

Le cellule aderiscono alle matrici extracellulari e tra di loro mediante specifici recettori di adesione

I recettori di adesione, o recettori adesivi, possono essere classificati sulla base della loro struttura che è riportata nella figura 16.1. Tra questi, vi sono recettori principalmente implicati in fenomeni adesivi che possono essere definiti stabili, quali quelli implicati nell'organizzazione di cellule in tessuti parenchimatosi (fegato, pancreas, polmone ecc.) o in epitelii di rivestimento (superfici mucose, endoteli). Nell'ambito delle adesioni stabili, le caderine sono le principali molecole adesive che mediano l'interazione cellula-cellula, mentre le integrine sono responsabili dell'interazione tra cellula e componenti delle matrici extracellulari. Altre interazioni adesive possono invece essere definite dinamiche, in quanto

soggette a un costante turnover. Le interazioni adesive di tipo dinamico sono quelle che caratterizzano cellule in movimento, ad esempio cellule mesenchimali (fibroblasti) nei tessuti interstiziali, cellule basali degli epitelii di rivestimento che migrano per sostituire le cellule di rivestimento vero e proprio, o cellule nervose, o meglio i prolungamenti delle stesse, durante lo sviluppo o la riparazione di danni neuronali. È importante notare che le cellule epiteliali che vanno incontro a trasformazione neoplastica possono acquisire nuove proprietà, riassunte con la definizione di transizione epitelio-mesenchimale, che comprendono la perdita di interazioni adesive stabili e l'acquisizione di interazioni adesive dinamiche che determinano un'aumentata capacità di migrazione negli interstizi tissutali (vedi didascalia della Figura 16.5). Una forma specializzata di adesione dinamica è quella che caratterizza le cellule leucocitarie (granulociti, monociti, cellule dendritiche, linfociti, cellule *natural killer*). Come verrà descritto in seguito, tali cellule sono in grado, dopo aver aderito all'endotelio vascolare, di migrare dal circolo sanguigno all'interstizio o, nel caso dei linfociti, all'interno degli organi linfoidi.

Le adesioni dinamiche che interessano cellule non empoietiche, e che riguardano esclusivamente interazioni cellula-matrice extracellulare, sono mediate prevalentemente da integrine. Le adesioni dinamiche che interessano i leucociti, e che coinvolgono anche interazioni leucocita-cellula endoteliale (esempio di adesione eterotipica, vale a dire tra cellule di diversa natura), sono mediate da diverse famiglie di recettori di adesione: le selettine, le integrine, le mucine e membri della superfamiglia delle immunoglobuline.

Va infine considerato nella sua specificità un altro fenomeno adesivo che interessa le piastrine, "citoplasti" (cel-

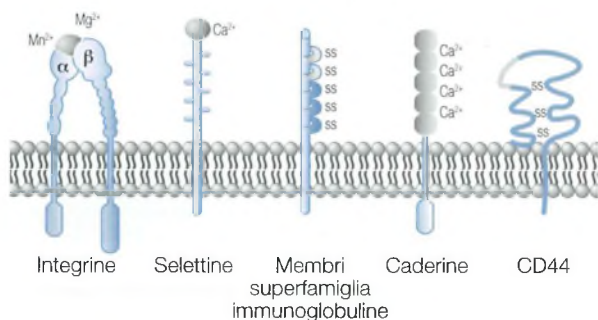


FIGURA 16.1 Principali recettori implicati nell'adesione cellulare. La figura riporta la struttura semplificata delle integrine, delle selettine, dei membri della superfamiglia delle immunoglobuline, delle caderine e del CD44. I domini implicati nell'interazione con il ligando sono colorati in grigio.

Il legame delle integrine ai loro rispettivi ligandi dipende da cationi divalenti, quali Mg^{2+} o Mn^{2+} . Un elenco delle integrine e dei loro ligandi principali è riportato nella tabella 16.1. Il legame delle selettine ai loro rispettivi ligandi è strettamente calcio-dipendente. I membri della superfamiglia delle immunoglobuline implicati in fenomeni adesivi comprendono ICAM-1,2,3, VCAM-1 e MAD-CAM. Queste molecole sono espresse dalle cellule endoteliali, ma anche da cellule infiammatorie e immunitarie (ICAM-3). Le caderine comprendono diversi membri e partecipano ad adesioni di tipo omotipico mediate da interazioni caderina-caderina. Anche la funzione adesiva delle caderine è strettamente calcio-dipendente. Il CD44 esiste in diverse forme prodotte per *splicing* alternativo che possono avere un diverso potere segnalante. Nella figura è mostrata l'isoforma più piccola (cosiddetta s, per standard) che è espressa ubiquitariamente. Il CD44 ha come ligando elettivo una componente della matrice extracellulare, l'acido ialuronico, ma può legare anche altri glicosaminoglicani, oltre che collagene, laminina e fibronectina.

lule prive di nucleo) circolanti che svolgono una funzione centrale nei meccanismi emostatici e nella riparazione di danni dell'endotelio vascolare. Le piastrine aderiscono a componenti del sottoendotelio e stabiliscono interazioni intercellulari molto stabili le quali sono responsabili dell'aggregazione piastrinica (esempio di adesione omotipica, vale a dire tra cellule uguali) e della formazione del cosiddetto "tappo piastrinico". Per quanto riguarda i recettori di adesione implicati nell'adesione e aggregazione piastrinica, vedi **CD**: Approfondimento 16.1. *Interazioni adesive e attivazione piastrinica.*

Le caderine svolgono un ruolo centrale nell'interazione tra cellule non emopoietiche

Le caderine partecipano alla formazione delle cosiddette "giunzioni aderenti" (*adherens junction*), siti di interazione tra cellule implicati non solo nella formazione di parenchimi e superfici mucose, ma anche delle giunzioni sinaptiche e del mantenimento dell'organizzazione di tessuti solidi come il muscolo cardiaco. Questa famiglia di proteine (Figura 16.1) è composta da diversi membri denominati sulla base della loro espressione tissutale E-caderine (epiteliali), M-caderine (muscolari), P-caderine (placentari), VE-caderine (dell'endotelio vascolare), N-caderine (neuronal) ecc. Esse si associano a formare omodimeri che interagiscono con caderine dello stesso

tipo espresse da cellule omologhe. Le interazioni mediate da caderine sono strettamente dipendenti da ioni calcio che si legano alla molecola. Nel versante intracellulare esse si associano ad altre proteine (catenine) e al citoscheletro (actina filamentosa). Le catenine sono presenti in tre isoforme dette α , β e γ (o placoglobina) che hanno capacità di interagire tra di loro e di legarsi all'actina e alla coda citoplasmatica delle caderine. Il complesso caderine-catenine-actina e altre proteine citoscheletriche (α -actinina) permette l'ancoraggio delle caderine nel loro versante citoplasmatico e funge inoltre da nucleo di aggregazione di altre molecole, comprese molecole segnalanti, che regolano funzioni cellulari (vedi oltre).

Le integrine rappresentano un'ampia famiglia di recettori implicati nell'adesione di cellule a proteine della matrice extracellulare e a contro-recettori cellulari

Le integrine sono eterodimeri costituiti dall'associazione non covalente tra una catena detta α e una catena detta β e vengono classificate in diverse sottofamiglie sulla base della struttura della catena β (Figura 16.1 e Tabella 16.1). Quest'ampia famiglia di recettori adesivi è implicata sia in interazioni cellula-matrice extracellulare che cellula-cellula.

L'espressione di diversi tipi di integrine in differenti tipi di cellule e il loro ampio spettro di riconoscimento determina il fatto che esse siano implicate in molti fenomeni biologici. In cellule mesenchimali ed epiteliali interazioni mediate da integrine regolano il differenziamento, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, e il movimento. Inoltre interazioni integrine-dipendenti regolano i complessi fenomeni relativi alla formazione delle terminazioni assoniche e dendritiche nelle cellule nervose. Nei leucociti, le integrine sono essenziali per mediare l'interazione con l'endotelio vascolare sia in condizioni normali, come ad esempio il ricircolo linfocitario dal sangue alle stazioni linfonodali, che patologiche, come ad esempio il reclutamento di cellule delle difese in siti di flogosi. Infine, un'integrina espressa selettivamente dalle piastrine, l'integrina $\alpha IIb\beta 3$ (Tabella 16.1) è essenziale per la formazione dell'aggregato piastrinico, un evento centrale nella riparazione dei danni vascolari e nell'arresto dei fenomeni emorragici.

Delle molteplici funzioni delle integrine verranno qui trattate quelle che sono state caratterizzate in maggiore dettaglio e per molte di esse sono stati individuati farmaci in grado di interferire con fenomeni integrine-dipendenti. Una caratteristica comune a molte integrine è quella di essere regolate nella loro funzione, e al tempo stesso di regolare, mediante trasduzione di specifici segnali, fenomeni intracellulari. Si fa riferimento alla prima di queste caratteristiche con il termine di *inside-out signalling*, vale a dire: un segnale originato dentro la cellula (*inside*) da diversi agonisti riconosciuti da altri recettori determina una modificazione conformazionale dell'integrina che coinvolge il dominio extracellulare (*out*) dell'integrina. Tale modificazione consente l'interazione dell'integrina stessa con l'appropriato ligando. L'interazione integrina-

ligando genera segnali all'interno della cellula – *outside-in signalling* –, vale a dire: successivamente al legame con l'appropriato ligando che coinvolge il dominio extracellulare (*outside*) dell'integrina viene generato un segnale all'interno della cellula (*in*). I meccanismi molecolari alla base dell'*inside-out* e *outside-in signalling* – verranno trattati in dettaglio successivamente.

Una caratteristica centrale nella funzione delle integrine è quella di agire come punto di aggregazione di complessi multiproteici all'interno della cellula. Questi complessi contengono diverse proteine citoscheletriche, che interagendo tra di loro con filamenti di actina e con la coda citoplasmatica delle catene β delle integrine formano una struttura tridimensionale che è stata paragonata a una tela di ragno. L'integrina legata al suo substrato (collagene, fibronectina ecc.) e il complesso di proteine citoscheletriche legato all'integrina nel versante citoplasmatico della cellula formano strutture che vengono definite, a seconda del loro grado di complessità e strutturazione come "contatti o adesioni focali" (*focal contacts* o *focal adhesions*). La formazione di adesioni focali rende l'adesione molto più stabile, in quanto l'interazione integrine-ligando viene per così dire "stabilizzata" dalle proteine citoscheletriche che si assemblano formando complessi multimerici in prossimità della coda citoplasmatica delle integrine. Questi siti di adesione possono essere soggetti a un costante turnover, soprattutto nelle cellule in movimento.

Differenti proteine citoscheletriche sono state dimostrate associarsi alla catena β di diverse sottofamiglie di integrine paxillina, α -actinina e filamina. Filamina e α -actinina interagiscono direttamente con l'actina. Talina e paxillina si legano a vinculina che può interagire con l'actina legandosi ad α -actinina o a tensina, un'altra proteina legante l'actina. Le interazioni tra le proteine citoscheletriche e la catena β delle integrine è essenziale per regolare, attraverso una modificazione conformazionale dell'integrina stessa, l'affinità dell'integrina per il proprio ligando.

Le integrine, assieme alle selettine, sono responsabili dell'adesione di cellule emopoietiche all'endotelio vascolare

Per il ruolo che svolgono nelle difese biologiche, le cellule leucocitarie hanno la capacità di migrare dal sangue all'interstizio sottoendoteliale ogni qualvolta si verifici un'infezione o un danno a un tessuto. I linfociti sono inoltre dotati della capacità di migrare dalle venule che attraversano i linfonodi nel linfonodo stesso (fenomeno della ricircolazione linfocitaria). La migrazione dei leucociti è stata caratterizzata avvenire secondo le seguenti tappe.

1. In una prima fase i leucociti interagiscono con l'endotelio (fenomeno definito aggancio, in inglese *tethering*) e "rotolano" su di esso (in inglese *rolling*); questo evento è mediato dall'interazione di selettine con mucine.
2. Durante il rotolamento essi vengono a contatto con molecole ad azione chemiotattica adsorbite sulla superficie dell'endotelio che vengono riconosciute da specifici recettori espressi dal leucocita. Tali recettori appartengono alla grande famiglia dei recettori accop-

piati a proteine G (vedi Capitolo 13). I segnali, definiti di *inside-out*, generati dall'interazione di appropriati ligandi con questi recettori inducono la terza delle tappe responsabili della migrazione leucocitaria.

3. Questa terza tappa è rappresentata da una forma di adesione che viene definita adesione "salda" ed è mediata dall'interazione tra integrine della sottofamiglia $\beta 1$ o $\beta 2$ e i loro ligandi espressi sulla superficie delle cellule endoteliali VCAM-1 e ICAM-1/2 (Figura 16.1 e Tabella 16.1). Essa dipende da un potenziamento della capacità adesiva delle integrine che viene definita con il termine generico di "attivazione". L'attivazione integrinica include due distinte modalità: a) modificazione conformazionale dell'eterodimero, con aumento dell'affinità (*inside-out signalling*, Figure 16.2 e 16.3); b) induzione di mobilità laterale dell'eterodimero, con formazione di clusters e aumento di valenza (Figura 16.2).
4. Solo successivamente all'adesione salda all'endotelio vascolare il leucocita si fa strada tra le giunzioni interendoteliali e migra nell'interstizio. Per quanto riguarda i meccanismi di adesione e reclutamento leucocitario, vedi **CD**: Approfondimento 16.2. *Interazioni adesive e reclutamento leucocitario.*

TABELLA 16.1 Classificazione delle integrine e loro principali ligandi

Sottofamiglia	Ligandi
$\beta 1$	$\alpha 1$ Collagene, laminina
	$\alpha 2$ Collagene, fibronectina, laminina, echovirus
	$\alpha 3$ Collagene, fibronectina, laminina
	$\alpha 4$ Fibronectina, VCAM-1
	$\alpha 5$ Fibronectina
	$\alpha 6$ Laminina
	$\alpha 7$ Laminina
	$\alpha 8$?
αv Vitronectina	
$\beta 2$	αL ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	αM Fibrinogeno, ICAM-1, ICAM-2, C3bi, fattore X, glucano, lipopolisaccaridi, componenti superficiali di agenti patogeni (<i>Leishmania</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Bordetella pertussis</i>), eparina ed eparan solfato
	αX Fibrinogeno, C3bi, lipopolisaccaride
	αD ICAM-3
$\beta 3$	αIIb Fibrinogeno, fibronectina, fattore di von Willebrand, trombospondina
	αv Vitronectina, fibrinogeno, fibronectina, fattore di von Willebrand, trombospondina, osteopontina, entactina
$\beta 4$	$\alpha 6$ Laminina
$\beta 5$	αv Vitronectina, HIV tat
$\beta 6$	αv Vitronectina
$\beta 7$	$\alpha 4$ Mad-CAM-1, VCAM-1, fibronectina
$\beta 8$	αv Vitronectina

Le integrine sono divise in sottofamiglie sulla base della sequenza della catena β . Vengono riportati i membri principali di ciascuna sottofamiglia. Come si nota, alcune catene α (ad esempio, αv) possono associarsi a diverse catene β . L'espressione di alcune integrine, ad esempio membri della sottofamiglia $\beta 1$ e $\alpha v \beta 3$ è ubiquitaria. Quella di altre è ristretta a specifici tipi di cellule. Ad esempio alla sottofamiglia $\beta 2$ si fa riferimento come "integrine leucocitarie" in quanto espresse esclusivamente da leucociti. L'integrina $\alpha IIb \beta 3$ è espressa esclusivamente da piastrine.

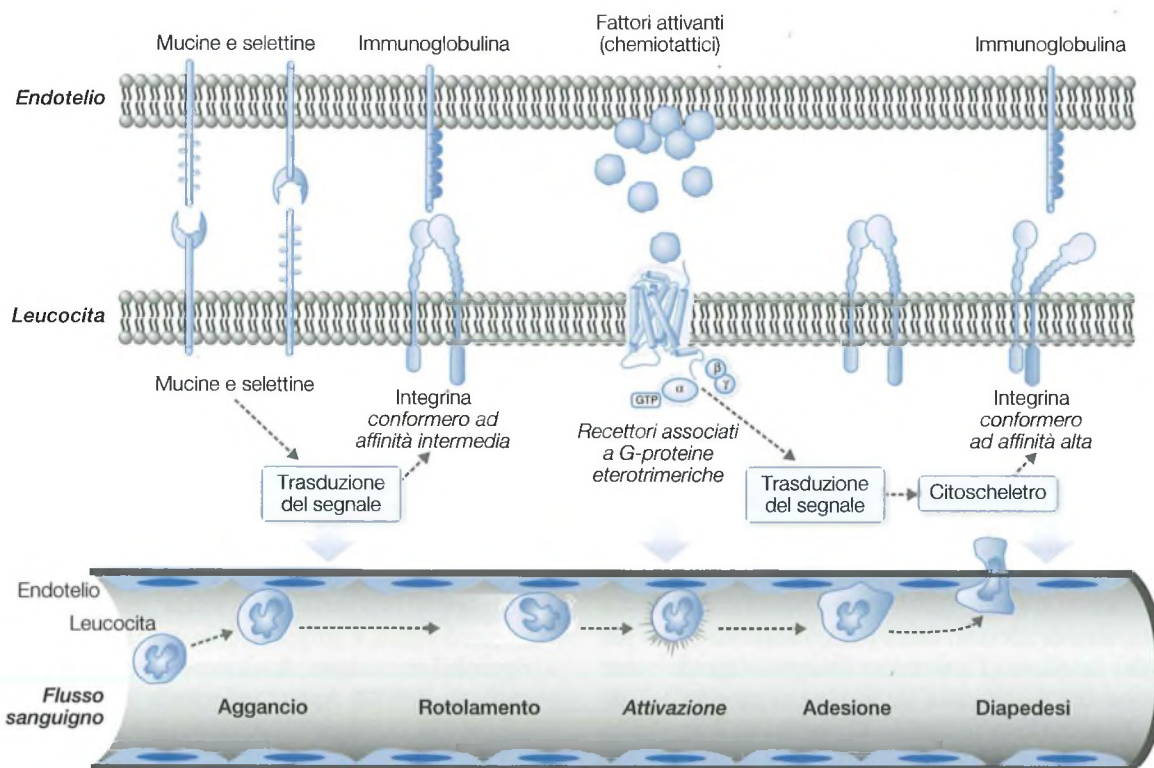


FIGURA 16.2 Il modello oramai validato che descrive l'accumulo dei vari tipi di leucociti in differenti distretti tissutali, in condizioni sia fisiologiche che patologiche, consiste di una sequenza stereotipata di eventi molecolari e cellulari. Durante il reclutamento leucocitario l'azione combinata di recettori di aggancio e rotolamento, come mucine e selettine, di fattori di attivazione, come i fattori chemiotattici, e di recettori di arresto, come le integrine e le immunoglobuline, genera un processo finemente regolato nel tempo e nello spazio il cui completamento porta il leucocita al di fuori del vaso sanguigno. In questo contesto, complessi sistemi intracellulari di trasduzione del segnale controllano differenti aspetti del processo. Ad esempio, la mucina PSGL-1 trasduce segnali intracellulari in grado di determinare la transizione dell'integrina da stato basso a stato intermedio di affinità favorendo così un rotolamento "lento" mediato da integrine. Al contrario, i fattori chemiotattici trasducono rapidissimi segnali intracellulari in grado di determinare la transizione completa dell'integrina da stato basso a stato alto di affinità, evento fondamentale per supportare l'arresto definitivo del leucocita sull'endotelio. Quest'ultimo meccanismo coinvolge proteine citoscheletriche, come talina1 e FERMT3 (kindlina 3) che si legano direttamente alla porzione citoplasmatica della catena β delle integrine e ne determinano la definitiva e stabile transizione conformerica ad alto stato di affinità. Il modello prevede che la diversità nella migrazione leucocitaria derivi dall'azione combinatoria di molecole adesive e fattori attivanti diversamente espressi sulla superficie sia dei leucociti che dell'endotelio vascolare. La diversità, di fatto, deriva dalla capacità o meno di determinate combinazioni di molecole adesive e fattori attivanti di generare la sequenza completa che conduca una certa cellula al di fuori del vaso sanguigno. Ad esempio, il granulocita neutrofilo esprime L-selettina (selettina che media il rotolamento) e α L β 2 (integrina che media l'adesione forte) ma non migra nei linfonodi che tuttavia esprimono PNA β e ICAM-1 (ligandi endoteliali per L-selettina e α L β 2, rispettivamente). Di fatto il neutrofilo rotola ma non aderisce e non migra all'interno del linfonodo. Questo suggerisce che il fattore necessario all'attivazione della adesione forte integrina-dipendente specifico per il neutrofilo non è presente nel linfonodo non infiammato. La sequenza è così incompleta e il neutrofilo torna nel circolo sanguigno. Anche i fattori attivanti, come le molecole adesive, dimostrano un grande livello di ridondanza e promiscuità ed è l'azione combinata di tutti gli elementi di controllo ai vari livelli che conduce alla migrazione selettiva. Possiamo così teorizzare l'esistenza di un "codice di area tissutale" per ogni tipo di leucocita (simile al codice di avviamento postale) formato dalla giusta selettina + la corretta integrina + l'adeguato fattore attivante + il corretto ligando endoteliale. Il leucocita per migrare in un certo tessuto o organo deve riconoscere il codice espresso dal distretto vascolare del tessuto stesso. In assenza di codice il leucocita rimane nel circolo sanguigno.

Le integrine e altri recettori adesivi sono responsabili dell'adesione e aggregazione delle piastrine

Qualsiasi lesione endoteliale viene riparata mediante l'azione coordinata di un sistema cellulare, le piastrine, e di uno proteico, per la gran parte solubile nel plasma, il sistema coagulativo. Questo processo riparativo, definito emostasi o processo emostatico, è fondamentale per impedire lo sviluppo di gravi emorragie, ma è al tempo

stesso alla base di uno dei più frequenti e potenzialmente mortali processi patologici, vale a dire la formazione dei trombi.

Il ruolo che svolgono le piastrine nell'emostasi è sostanzialmente dipendente da fenomeni adesivi. Le piastrine aderiscono a proteine presenti nel sottoendotelio e si aggregano fra di loro formando una specie di tappo piastrinico. Questi due fenomeni dipendono dall'interazione: a) tra recettori adesivi e proteine presenti nelle matrici extracellulari (adesione); b) tra recettori adesivi e proteine

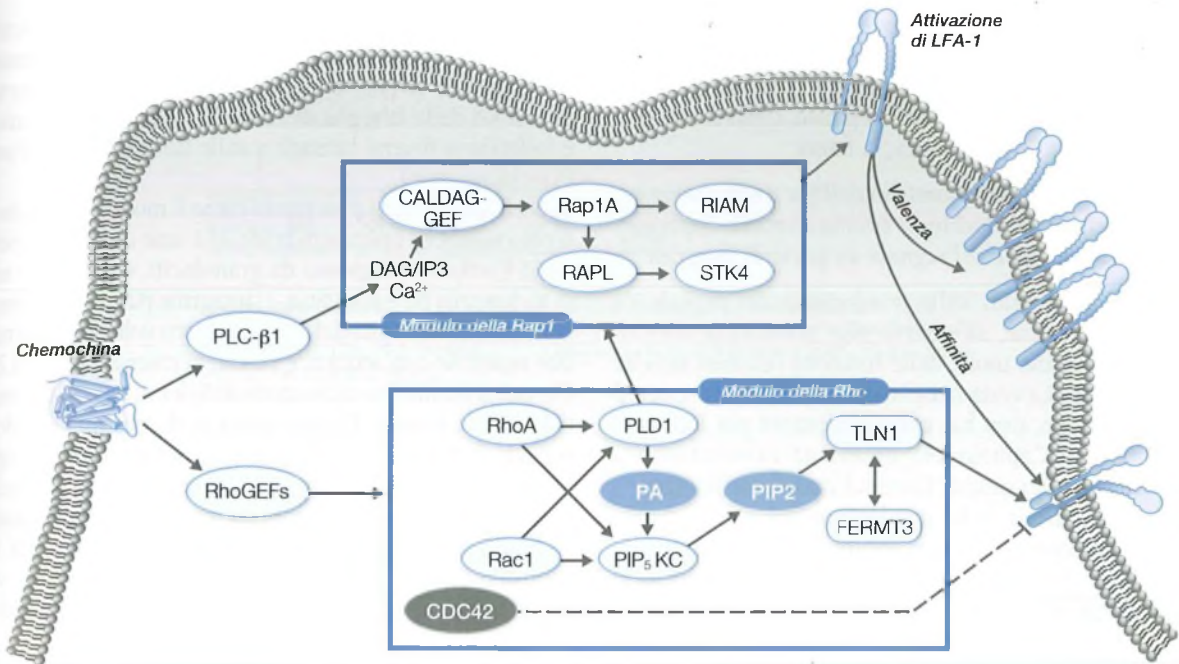


FIGURA 16.3 Le vie di trasduzione dei segnali intracellulari che regolano l'attivazione integrinica sono straordinariamente complesse e solo parzialmente conosciute. Sono note almeno 68 molecole dei sistemi di trasduzione del segnale in grado di modulare vari aspetti dell'adesività integrina-dipendente. Tuttavia, è probabile che debba esistere un notevole livello di diversificazione e specificità nei meccanismi di trasduzione del segnale che regolano le integrine. Due sono i principali meccanismi noti e maggiormente studiati: il modulo della Rho e il modulo della Rap1A. Nella figura, sono riportati i componenti di questi due moduli di segnalazione del contesto dell'attivazione integrinica da parte di chemochine. Nel modulo della Rho, fattori di scambio GDP-GTP attivano la RhoA e la Rac1 che, a loro volta, attivano la PLD1 che, a sua volta, attiva la PIP₅KC mediante la sintesi di acido fosfatidico (PA). Inoltre la PIP₅KC può essere attivata direttamente da RhoA e Rac1. La PIP₅KC genera PIP₂ che, a sua volta, attiva TLN1 (Talina 1) e, probabilmente, FERMT3 (Kindlin 3). Queste due ultime proteine citoscheletriche, infine, sono determinanti per l'induzione dello stato di affinità alto che media l'arresto sotto flusso dei leucociti. Nel modulo della Rho, CDC42, benché correlata da forte omologia a RhoA e Rac1, svolge un ruolo di regolatore negativo. Nel modulo della Rap1A, l'accumulo di calcio e DAG generati dall'azione della fosfolipasi C (PLC-β1) attiva il fattore di scambio GDP-GTP CalDAG-GEF che, a sua volta, attiva la Rap1A; la Rap1A, quindi, attiva RAPL, RIAM e STK4. Benché non sembri coinvolto nella regolazione dell'affinità integrinica, il modulo della Rap1A ha un ruolo centrale nella regolazione della adesività tramite la regolazione della stabilizzazione della interazione integrina-ligando. Nella figura, tutte le frecce sono attivatorie, tranne che per il CDC42 che, in maniera ancora non definita, inibisce l'attivazione integrinica. Inoltre, è anche riportata la possibilità che il modulo della Rap1A sia attivato dal modulo della Rho mediante la funzione di PLD1.

presenti nel plasma oppure contenute in granuli piastrinici e rilasciate in seguito a un evento di degranulazione. Per quanto riguarda i meccanismi di adesione e aggregazione piastrinica *vedi* CD: Approfondimento 16.2.

Trasduzione di segnali all'interno della cellula

I recettori di adesione non mediano soltanto l'adesione vera e propria, ma sono in grado di modulare diverse funzioni cellulari. In generale, le funzioni cellulari regolate da molecole adesive includono il movimento, la trascrizione genica, la proliferazione e sopravvivenza cellulare e funzioni cellulari specifiche in cellule emopoietiche.

Le integrine sono i recettori di adesione la cui capacità di generare segnali è stata maggiormente indagata. Tuttavia, anche caderine, slettine, CD44 e altre molecole adesive (ICAM-1, PSGL-1, PECAM-1) hanno questa capacità. Poiché i meccanismi di trasduzione del segnale da parte di integrine sono stati caratterizzati in molti dettagli, è

a questi che verrà riservata maggiore attenzione nella trattazione seguente.

Le integrine trasducono segnali inducendo la formazione di complessi multimolecolari contenenti proteine citoscheletriche e molecole segnalanti

Come precedentemente discusso, le integrine inducono l'assemblaggio al di sotto della membrana plasmatica di complessi multimolecolari costituiti da proteine citoscheletriche e molecole che si possono genericamente definire segnalanti. È generalmente accettato il concetto che l'assemblaggio di questo complesso multimolecolare rappresenta il meccanismo caratteristico con cui le integrine trasducono segnali all'interno della cellula. Va sottolineato che le interazioni tra le diverse componenti molecolari finora identificate definiscono una rete di grande complessità, la cui logica non è facilmente analizzabile con i metodi tradizionali della biologia molecolare e cellulare di tipo riduzionistico. Interazioni multimolecolari complesse sono state identificate in diversi campi della biologia e sta emergendo un nuovo approccio

metodologico per affrontare tale complessità che è stato definito "biologia dei sistemi" (o biologia computazionale) e che prevede l'interazione tra discipline che hanno finora lavorato in modo parallelo, ma separato, quali la biologia, l'informatica e la matematica, la fisica.

FAK e membri della famiglia dell'Src costituiscono le principali tirosinchinasi citoplasmatiche implicate nella trasduzione del segnale da parte di integrine

Fin dai primi studi sulla trasduzione del segnale da parte di integrine, si osservò che inibitori di tirosinchinasi bloccano molte delle funzioni cellulari attivate da integrine. La coda citoplasmatica delle catene α e β delle integrine, non ha, come i recettori per fattori di crescita (vedi Capitolo 14), un'attività tirosinchinasi intrinseca. Sono quindi tirosinchinasi citoplasmatiche a essere implicate nella trasduzione del messaggio da parte di integrine. Diversi approcci sperimentali suggeriscono che FAK (*Focal Adhesion Kinase*) e membri della famiglia dell'Src (Figura 16.4) svolgono un ruolo centrale in questo evento.

I meccanismi con i quali le integrine attivano FAK e Src non sono del tutto noti. Indipendentemente dai loro meccanismi di attivazione, FAK e Src sono implicate in un circuito a carattere di *feed-back* positivo nella generazione di segnali da parte delle integrine (Figure 16.4 e 16.5). È importante notare come si siano accumulate molte evidenze che FAK e Src sono attivate in diversi tipi di tumori umani, suggerendo che esse rappresentano un importante bersaglio molecolare per la terapia dei tumori. Per quanto riguarda i meccanismi di trasduzione del segnale da parte di FAK e Src, vedi **CD**: Approfondimento 16.3. *Trasduzione del segnale da parte delle chinasi FAK e Src.*

La trasduzione del segnale da parte di integrine e PSGL-1 in cellule leucocitarie richiede tirosinchinasi della famiglia dell'Src, adattori implicati nella trasduzione del segnale da parte di recettori immuni e la tirosinchinasi Syk

In cellule emopoietiche recettori adesivi trasducono il segnale secondo un modulo specifico che coinvolge tirosinchinasi della famiglia dell'Src, adattori contenenti un dominio ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) e la tirosinchinasi Syk. Questo modulo è stato inizialmente caratterizzato in cellule delle difese biologiche nel contesto di quelli che vengono definiti recettori immuni. Recettori per l'antigene sui linfociti T e B, o per le immunoglobuline G o E (recettori Fc γ o Fc ϵ rispettivamente) sulle cellule delle difese innate o sui mastociti, attivano, successivamente all'interazione con l'appropriato ligando, tirosinchinasi della famiglia dell'Src. Queste fosforilano due residui di tirosina contenuti nelle classiche sequenze ITAM presenti in molecole accessorie associate ai recettori immuni. Tali molecole accessorie variano da recettore a recettore e comprendono etero-dimeri γ/ϵ o δ/ϵ nei linfociti T, etero-dimeri Ig α /Ig β nei linfociti B o omo-dimeri ζ/ζ nei linfociti T o γ/γ nelle cellule mieloidi. Alle tirosine fosforilate della sequenza ITAM si legano le

tirosinchinasi ZAP-70, nei linfociti T, o Syk nei linfociti B e in tutte le altre cellule leucocitarie. Successivamente al legame con sequenze ITAM e a fosforilazione da parte di chinasi della famiglia dell'Src, ZAP-70/Syk si attivano e fosforilano diversi bersagli a valle (fosfolipasi C γ , Vav, PI3-chinasi ecc.).

Recenti studi hanno dimostrato come il modulo sopra descritto sia anche utilizzato da PSGL-1, uno dei ligandi per P- ed E-selectina espresso da granulociti, e da integrine della famiglia $\beta 2$ e $\beta 3$. PSGL-1, integrine $\beta 2$ e $\beta 3$ attivano chinasi della famiglia dell'Src che a loro volta fosforilano due molecole con sequenze ITAM, la catena γ e DAP12. Ciò porta a completa attivazione di Syk e alla trasduzione del segnale a valle. Questo modulo di trasduzione del segnale regolerebbe il rotolamento lento (*slow rolling*, Figura 16.2) dei granulociti e il loro reclutamento in sedi di flogosi. Queste osservazioni hanno spinto ricerche tese a identificare inibitori di Syk quali nuovi farmaci per il controllo dell'infiammazione. Va inoltre notato come vi siano evidenze che tale modulo possa anche regolare funzioni di osteoclasti e piastrine.

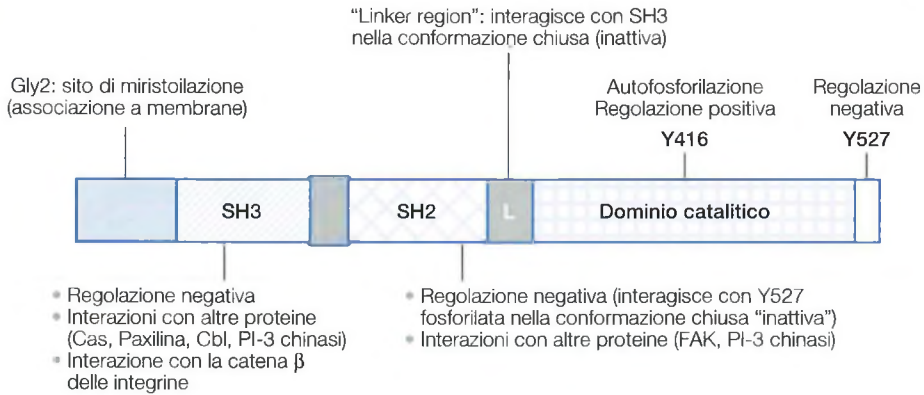
Meccanismi di traduzione del segnale da parte di caderine

Nella figura 16.6 sono illustrati sinteticamente alcuni dei meccanismi considerati responsabili della trasduzione del segnale da parte di caderine. Va sottolineato che i segnali generati da caderine sono stati implicati nella stabilizzazione delle adherens junctions e anche nella organizzazione di altre forme di interazione inter-cellulare (*tight junctions* e desmosomi). Da questa implicazione è derivato il convincimento che alta espressione di caderine a normale funzione segnalante favorisca la differenziazione e l'appropriata polarizzazione cellulare nei tessuti e, al contrario, bassa espressione di caderine e/o alterata trasduzione del segnale accompagnino il fenotipo di cellule invasive quali quelle tumorali.

Meccanismi di traduzione del segnale da parte di CD44

Il CD44 (Figura 16.1) partecipa alla traduzione del segnale mediante diversi meccanismi, sia diretti che indiretti. Ad esempio, esso può agire come una "piattaforma" legando precursori di fattori di crescita facilitandone la conversione in forma attiva da parte di metallo proteasi, anch'esse associate a CD44. Un altro meccanismo d'azione del CD44 sembra essere la sua capacità di funzionare da co-recettore per fattori di crescita favorendo la formazione di complessi tra fattore di crescita, recettore specifico e CD44. Va notato che la capacità di svolgere tale ruolo varierebbe molto tra le diverse varianti di splicing (Figura 16.1) del CD44. Il fatto che certi tumori abbiano particolari varianti di splicing di CD44 potrebbe determinare una loro maggiore capacità proliferativa o invasività. Infine il CD44, analogamente a integrine e caderine, può organizzare complessi multimolecolari legando proteine citoscheletriche della famiglia ERM (ezrina, radixina, moesina). Queste a loro volta possono legarsi ad actina filamentosa e, indirettamente, ad altre proteine.

SRC



FAK

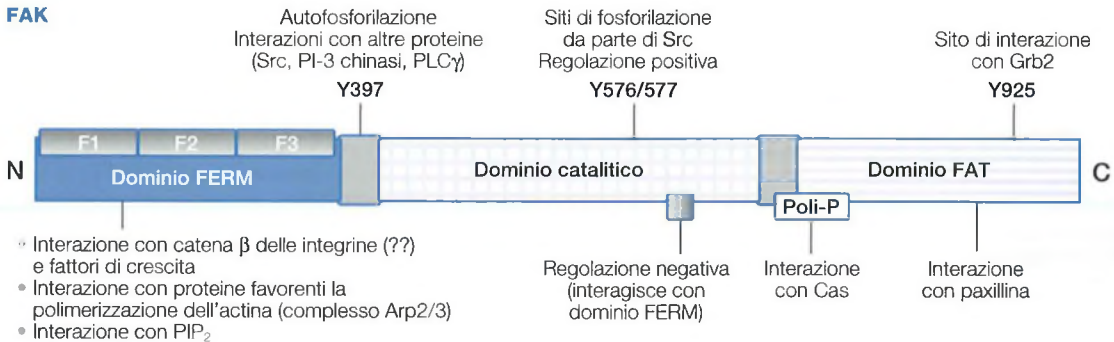


FIGURA 16.4 Caratteristiche strutturali e organizzazione dei domini di Src e FAK. La famiglia dell'Src comprende otto membri con omologia strutturale e differenzialmente espressi in diversi tipi di cellula: Src, Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Yes. Membri di questa famiglia sono implicati nella trasduzione del segnale da parte di diversi tipi di recettori. Mentre Src, Fyn e Yes sono ubiquitari, Fgr, Hck, Lck e Lyn sono prevalentemente espressi in cellule leucocitarie. I domini principali di Src sono presenti anche in diverse altre proteine. Il dominio SH2 (SH, *Src Homology*) è implicato nell'interazione con tirosine fosforilate; il dominio SH3 con sequenze ricche di prolina. Membri dell'Src possono interagire con diverse proteine, tra cui quelle indicate. Con l'eccezione di Src e Blk, gli altri membri della famiglia contengono una cisteina in posizione 3 che consente l'attacco di una molecola di acido palmitico. La palmitoilazione favorisce la localizzazione nella faccia interna della membrana plasmatica nei cosiddetti *raft* di membrana, microambienti lipidici a composizione particolare. La tirosina Y527, se fosforilata, consente un'interazione inter-molecolare con il dominio SH2. Tale conformazione chiusa, inattiva, è stabilizzata dall'interazione tra il dominio SH3 e la linker region che viene "spinta" contro il dominio chinasico. L'attivazione di Src può avvenire: per defosforilazione di Y527, per interazione di altre proteine con SH2 e/o SH3, per fosforilazione di Y416. Come emerso da recenti studi, Src si lega alla catena β delle integrine attraverso il dominio SH3. L'espressione di FAK, o del suo omologo Pyk2 è ubiquitaria. N e C-terminali di FAK regolano la sua interazione con diverse proteine. Non è stato del tutto chiarito se FAK si lega direttamente alla catena β delle integrine. Il suo meccanismo di attivazione è però analogo a quello di Src. Nella forma inattiva FAK è chiusa mediante interazioni intramolecolari tra il sub-dominio F2 del dominio FERM (*Four-point-one, Ezrin, Radixin Moesin*) e il dominio chinasico. In seguito all'associazione di una lipide chinasi, la fosfatidil inositolo-4-fosfato 5-chinasi di tipo 1 γ (Ptlns(4P)5K1 γ), con talina legata alle integrine viene attivata la formazione di PIP₂ (fosfatidil inositolo-4,5-bisfosfato). PIP₂ si lega al dominio FERM rompendo l'interazione intramolecolare tra questo e il dominio chinasico. Successivamente a questo primo evento attivante, FAK si autofosforila nella tirosina 397, lega Src e viene fosforilata da Src nei residui di tirosina 576 e 577 con conseguente piena attivazione. Diversi residui di tirosina mediano, se fosforilati, interazione con proteine contenenti domini SH2. Sequenze ricche di prolina mediano interazioni con proteine contenenti domini SH3. Va infine sottolineato che FAK contiene sequenze che ne condizionano la localizzazione nucleare. Nel nucleo FAK può favorire la trascrizione di diversi geni implicati nella regolazione del ciclo cellulare. In figura i domini caratteristici delle due chinasi sono colorati in azzurro. In grigio sono colorate le sequenze amminoacidiche di raccordo tra questi domini.

Terapie anti-adesive

Molti approcci sperimentali hanno inequivocabilmente dimostrato che bloccando l'adesione in vivo si possono prevenire molti dei tipici danni derivanti dallo sviluppo di processi infiammatori, compreso quel particolare tipo di danno definito "da ripercussione" e considerato importante corresponsabile della necrosi di tessuti ischemici. Esiste quindi un razionale per cercare di identificare farmaci "anti-adesivi".

Affinché un farmaco abbia azione "anti-adesiva" deve essere in grado di interferire con uno dei seguenti fenomeni:

- l'espressione di quei recettori di adesione che vengono espressi sulla superficie cellulare soltanto in seguito alla stimolazione della cellula con appropriati stimolanti;
- l'interazione vera e propria recettore adesivo-ligando;
- la generazione di segnali da parte dei recettori adesivi stessi.

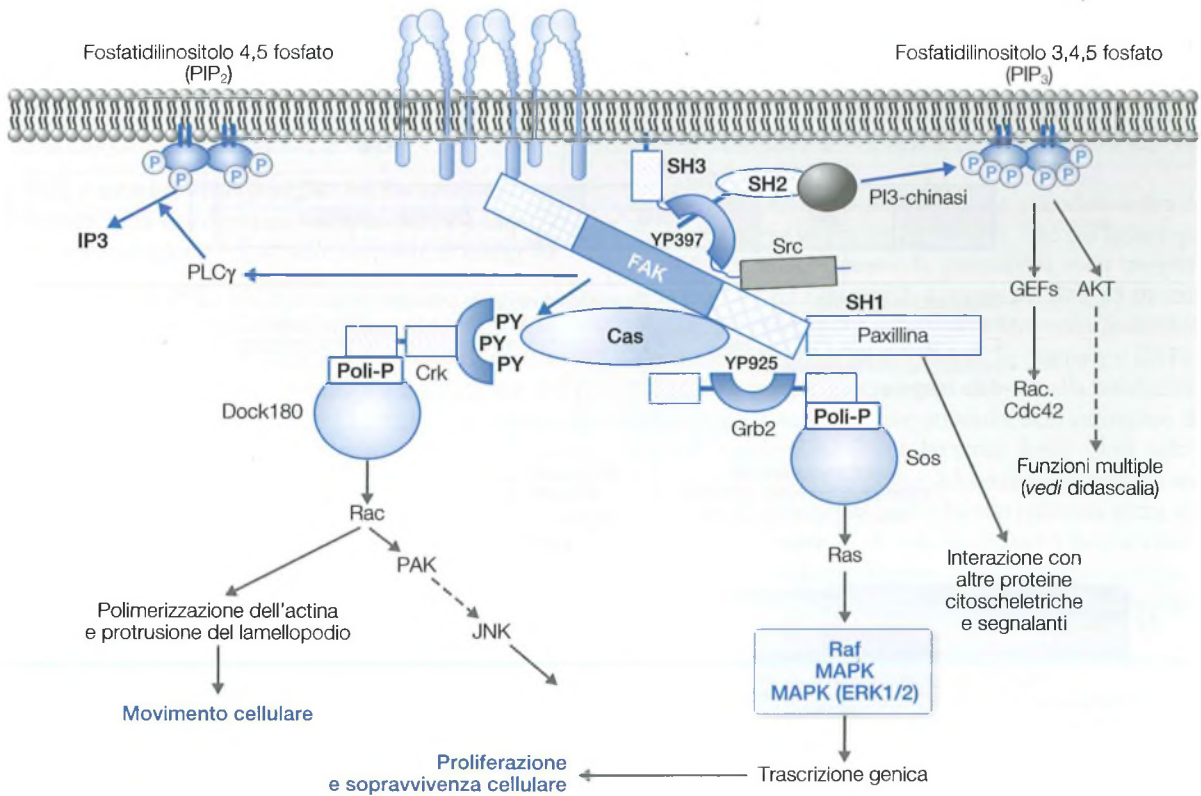


FIGURA 16.5 Meccanismi di trasduzione del segnale da parte di integrine. La figura riporta un modello rappresentativo dei meccanismi con cui la redistribuzione in siti discreti (clustering) di integrine sulla membrana plasmatica attiva funzioni cellulari. L'interazione di integrine con appropriati ligandi determina la formazione di complessi multimolecolari associati alle integrine e costituiti da proteine citoscheletriche (vedi testo), le tirosinchinasi FAK e Src, e altre proteine. I meccanismi di fosforilazione di Y397 di FAK sono descritti nel testo e nella didascalia della figura 16.4. Se fosforilata, Y397 può mediare il legame di Src, ma anche di fosfolipasi Cy ($PLC\gamma$) e fosfatidilinositolo 3 chinasi (PI3-chinasi). $PLC\gamma$ determina il turnover dei fosfoinositidi (vedi Capitolo 10). PI3-chinasi fosforila inositol 4,5 bifosfato in posizione 3 generando un sito di legame per proteine contenenti un dominio PH. Molti GEFs, ad esempio Vav, contengono un dominio PH. Un'altra importante proteina che contiene un dominio PH e si lega a PIP_3 è la serina/treonina chinasi AKT (anche chiamata PKB). AKT è un nodo critico di trasduzione del segnale da parte di diversi recettori che, attivando PI3-chinasi, formano PIP_3 . AKT attivata in seguito al legame a PIP_3 e alla fosforilazione in un residuo di serina e in uno di treonina da parte di altre chinasi, regola importanti risposte biologiche. Tra queste, attiva indirettamente il complesso mTOR che regola la sintesi proteica e la trascrizione genica, inibisce diverse proteine che inducono apoptosi, regola positivamente l'ingresso di glucosio aumentando l'espressione sulla superficie di trasportatori GLUT4. AKT è considerata un importante oncogene e un suo guadagno di funzione (*gain of function*) rappresenta uno degli eventi centrali nella trasformazione neoplastica. FAK e Src possono fosforilare Cas che si associa attraverso un suo dominio SH3 (non mostrato) a sequenze ricche di prolina di FAK (non mostrate, vedi figura 16.4). Cas lega Crk che a sua volta può legare un GEF per Rac, Dock180. Rac e le altre RhoGTPasi possono essere attivate anche in seguito ad associazione di varie proteine con paxillina una volta che questa viene fosforilata da FAK e Src (non mostrato). La tirosina 925 di FAK lega, nella forma fosforilata, l'adattatore Grb2 che lega un GEF per Ras, Sos. Ciò determina attivazione di una delle cascate di MAP chinasi (vedi Capitolo 8). Attivazione della MAP kinasi JNK può avvenire anche attraverso Rac attivato da Cas-Crk-Dock180. L'attivazione di queste diverse vie causa importanti risposte cellulari: proliferazione, sopravvivenza, inibizione dell'apoptosi, secrezione di proteine (non mostrata), movimento, adesione salda. Le frecce blu indicano proteine che vengono fosforilate da FAK (o Src) o il substrato di enzimi ($PLC\gamma$, PI3-chinasi). Le frecce nere indicano le vie di attivazione di Rho GTPasi e altre vie di trasduzione del segnale.

Per quanto riguarda il primo meccanismo va sottolineato che alcuni classici farmaci antinfiammatori sono stati riconosciuti in grado di interferire con l'espressione di molecole adesive. Ad esempio, FANS, corticosteroidi e colchicina inibiscono l'espressione di selettine sulla superficie di leucociti e/o cellule endoteliali. Inoltre i corticosteroidi inibiscono l'espressione di ICAMs da parte delle cellule endoteliali.

L'interferenza con l'interazione tra recettori adesivi e i rispettivi ligandi rappresenta un bersaglio difficile. Le interazioni adesive sono rappresentate da interazioni

proteina-proteina o, nel caso delle selettine, proteina-carboidrati. Esperimenti negli animali hanno dimostrato che ligandi oligosaccaridici di selettine o selettine ricombinanti iniettate endovena bloccano l'adesione dei neutrofilo e riducono il danno tissutale in modelli di infiammazione sperimentale. È importante però sottolineare sono già in uso terapie anti-adesive finalizzate all'inibizione dell'adesione e aggregazione piastrinica e dell'adesione di leucociti a contro-recettori endoteliali. La prima di queste è basata sull'uso del frammento Fab di un anticorpo monoclonale che si lega all'integrina

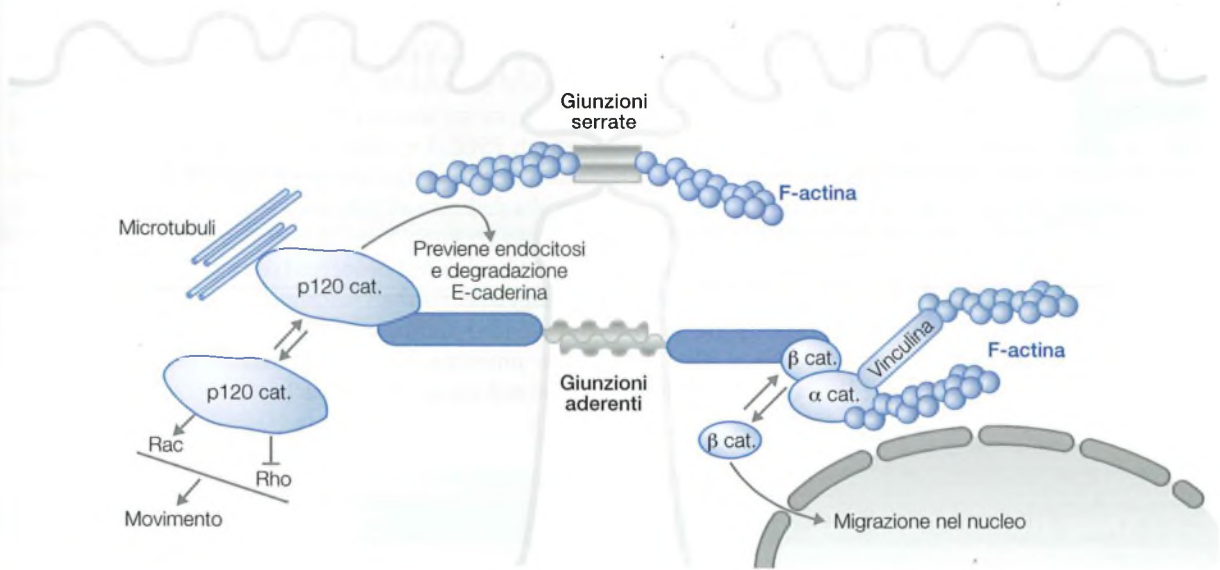


FIGURA 16.6 Le caderine sono responsabili della formazione di giunzioni aderenti, uno dei 3 complessi molecolari che mediano la formazione di giunzioni intercellulari nelle cellule epiteliali, oltre alle giunzioni serrate e ai desmosomi (non mostrati in figura). Le caderine interagiscono indirettamente sia con filamenti di actina che con microtubuli. α catenina, che si associa a β catenina, può legare F-actina sia direttamente che tramite l'interazione con vinculina o altre proteine leganti l'actina (parte destra della figura). p120 catenina (parte sinistra della figura), ma anche β catenina (non mostrata) mediano interazione con i microtubuli. Le interazioni proteina-proteina mostrate possono interessare una singola molecola di caderina; sono state separate nella figura soltanto per poterle illustrare più chiaramente. Va notato che sia p120 che β catenina possono passare da una forma legata alle caderine a una forma libera nel citoplasma. Mentre l'associazione di p120 catenina con la caderina ne previene l'endocitosi e la degradazione, nella forma libera nel citoplasma p120 catenina attiva le GTPasi Cdc42 e Rac e inibisce la GTPasi Rho. Cdc42 e Rac promuovono il movimento cellulare. Siccome Rho favorisce la formazione di *stress fibers*, vale a dire di fasci di filamenti di actina caratteristici di cellule stabilmente adese a un substrato, l'inibizione di Rho favorirebbe, assieme alla contemporanea attivazione di Cdc42 e Rac il movimento cellulare. Il distacco di β catenina dalle caderine consente la sua migrazione nel nucleo dove agisce come fattore di trascrizione per geni implicati nella regolazione del ciclo cellulare. Un aspetto peculiare delle cellule epiteliali neoplastiche maligne è la cosiddetta transizione epitelio-mesenchimale (vedi testo). Questo fenomeno è considerato dipendere dall'innescarsi di un circolo vizioso in cui una ridotta espressione di caderine comporta un aumento delle forme citoplasmatiche di p120 e β catenina. p120 citosolica riduce le interazioni adesive caderina-mediate e aumenta la motilità cellulare. β catenina libera favorisce, dopo la sua migrazione nel nucleo, la trascrizione di geni regolanti la proliferazione cellulare.

α IIb β 3 espressa dalle piastrine bloccandone l'interazione con il fibrinogeno. Tale Ab, chiamato abciximab (c7E3 Fab) viene usato per ridurre il rischio di complicanze ischemiche che si verificano successivamente a interventi di angioplastica (disostruzione di coronarie interessate da lesioni aterosclerotiche). La terapia con c7E3 rappresenta la prima terapia "anti-integrinica" utilizzata con successo e apre importanti prospettive nel campo delle terapie anti-adesive. Più recentemente sono stati prodotte altre molecole in grado di interferire con l'interazione tra α IIb β 3 e fibrinogeno. Queste includono un peptide chiamato eptifibatide (Integrilin) e rappresentativo della sequenza amminoacidica dell'integrina che lega il fibrinogeno. Le terapie "anti-integriniche" comprendono anche approcci tesi a competere con l'interazione tra l'integrina α 4 β 1 e i suoi contro-recettori endoteliali (VCAM). Tali interazioni svolgono un ruolo centrale nel reclutamento di linfociti e monociti nei siti infiammatori (vedi sopra). Un anticorpo anti- α 4 (natalizumab, Tysabri) si è rivelato utile per il trattamento di sclerosi multipla, una patologia in cui l'infiltrazione di linfociti e monociti è determinante nell'indurre il danno tissutale. Meno evidente è l'effetto di natalizumab per il controllo di un'altra patologia infiammatoria cronica quale il morbo di Crohn.

Il terzo fenomeno implicato nell'adesione da considerare un potenziale bersaglio terapeutico è rappresentato da eventi successivi all'interazione recettore adesivo-ligando. Come descritto in precedenza, le integrine inducono la formazione di adesioni focali (focal adhesions) rappresentate dall'assemblaggio al di sotto della membrana plasmatica di diverse proteine, sia citoscheletriche che segnalanti. Tale fenomeno rende più stabile l'adesione ed è anche implicato nella trasduzione di segnali. L'interferenza con la formazione di adesioni focali può avere effetto anti-adesivo. Infatti, molecole come adenosina, agonisti dei recettori A2 per l'adenosina, "leumidine" (derivati della N-carbossi-L-Leucina-N-[2,7-dimetilfuorene-9il]-metil estere), ossido d'azoto (NO) e inibitori di tirosinchinasi inibiscono l'adesione di neutrofilo sia in vitro che in vivo, agendo probabilmente come inibitori del riarrangiamento del citoscheletro indotto dalle integrine. È importante notare che inibitori di tirosinchinasi bloccano molti dei segnali generati da integrine e inibiscono la polimerizzazione del citoscheletro e l'attivazione di molte funzioni integrine-dipendenti. In questo contesto è importante notare come la ricerca di nuovi farmaci antineoplastici abbia portato alla scoperta e all'uso di un importante farmaco in grado di inibire Abl, una ti-

rosinchinasi citoplasmatica la cui iperattivazione induce una forma di leucemia, la leucemia mieloide cronica (CML). L'imatinib (Gleevec) è il farmaco di elezione per il trattamento della CML, ma, siccome mutazioni nella chinasi ne riducono l'efficacia in una certa percentuale di casi, sono stati generati inibitori di seconda generazione, alcuni dei quali sono in grado di inibire anche chinasi della famiglia dell'Src. Tali inibitori di Src si sono rivelati in grado di inibire proliferazione e invasività di cellule neoplastiche, in particolare di tipo mammario, in modelli sperimentali vitro e in vivo. Non è forse lontano il momento in cui processi regolati da integrine come la proliferazione e l'invasività di cellule

neoplastiche, verranno controllati farmacologicamente mediante inibitori di tirosin chinasi.

Va infine sottolineato che sulla base dei progressi delle conoscenze sui meccanismi di trasduzione del segnale da parte di PSGL-1 e integrine leucocitarie nei granulociti neutrofili, e in particolare dell'importanza di chinasi della famiglia dell'Src e di Syk, sono stati sviluppati inibitori di Syk, uno dei quali, R788, è stato recentemente oggetto di uno studio di fase 2 in soggetti con artrite reumatoide. Gli incoraggianti risultati ottenuti suggeriscono che terapie con inibitori di tirosinchinasi potrebbero venir utilizzate in un prossimo futuro per il trattamento di patologie infiammatorie acute e croniche.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'adesione tra cellula e cellula e tra cellula e matrice extracellulare è implicata nella regolazione di importanti funzioni cellulari quali la costituzione dei tessuti, il reclutamento di cellule dai vasi all'interstizio e la riparazione dei danni vascolari.
- ▶ L'adesione mediata dalla più ampia famiglia di molecole adesive, le integrine, è regolata mediante un meccanismo denominato "inside-out signalling" che comporta la generazione di segnali intracellulari da parte di agonisti di varia natura i quali determinano una modificazione conformazionale dell'integrina che acquisisce la capacità di interagire con il suo ligando con alta affinità.
- ▶ L'aumento dell'affinità integrinica è un processo fondamentale nel regolare il reclutamento leucocitario dei vasi all'interstizio e l'aggregazione piastrinica.
- ▶ Molecole adesive come le integrine, le mucine e le caderine trasducono, successivamente all'interazione con il ligando, segnali intracellulari che regolano la proliferazione, la sopravvivenza e il movimento.
- ▶ Nuovi farmaci interferiscono con l'adesione integrine-dipendente inibendo il reclutamento leucocitario in patologie autoimmuni e l'aggregazione piastrinica in patologie trombotiche.

Bibliografia essenziale

- ▶ Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signalling machine. *Cell* 2002;110:673-87.
- ▶ Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:283-323.
- ▶ Legate KR, Fassler R. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci* 2009;122:187-98.
- ▶ Miranti CK, Brugge JS. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nature Cell Biol* 2002;4:83-90.
- ▶ Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010;10:387-402.
- ▶ Moser M, Legate KR, Fassler R. The tail of integrins, talin and kindlins. *Science* 2009;324:895-99.
- ▶ Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* 2003;112:535-48.
- ▶ Provenzano PP, Keely PJ. The role of focal adhesion kinase in tumor initiation and progression. *Cell Adhes Migr* 2009;3/4:347-50.
- ▶ Weisberg E, Manley PW, Cowan-Jacob S et al. Second generation inhibitors of BCR_ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2007;7:345-56.

I recettori solubili e gli anticorpi monoclonali diretti contro agonisti e recettori

Alberto Mantovani

Obiettivi formativi

- Comprendere il concetto di recettore decoy
- Acquisire la conoscenza dei meccanismi di generazione dei recettori solubili
- Conoscere, con esempi i meccanismi e il potenziale degli anticorpi monoclonali come strumenti terapeutici

Gli anticorpi e i recettori solubili costituiscono una strategia per catturare e bloccare l'azione di mediatori, in particolare mediatori polipeptidici quali citochine e fattori di crescita, prima che essi interagiscono con i loro recettori. Questa strategia è concettualmente semplice. È interessante notare come, con l'eccezione della terapia sierica contro le tossine e i veleni che si riferisce a un settore diverso da quello che stiamo trattando, il blocco degli agonisti non ha ricevuto grande attenzione negli approcci farmacologici classici.

Con l'avvento dell'era delle citochine, questo quadro generale è mutato in modo drammatico. Gli anticorpi bloccanti costituiscono la strategia anti-citochinica che è stata utilizzata in modo più esteso in una patologia umana, con risultati importanti, costituendo così un paradigma su cui si sono confrontate ed evolute strategie terapeutiche successive.

Infatti, gli anticorpi monoclonali diretti contro il fattore di necrosi tumorale (TNF) hanno costituito un paradigma, dimostrando il potenziale terapeutico di questi nuovi approcci farmacologici. Mentre il meccanismo di azione di anticorpi bloccanti e recettori solubili è intuitivamente semplice, la realtà può essere più complessa. Infatti anticorpi e recettori solubili possono avere interazioni complesse con l'agonista, fungendo ad esempio come sistema di delivery o prolungando l'emivita di molecole agoniste.

La possibilità stessa di utilizzare queste molecole come strumenti di intervento farmacologico ha costituito un forte stimolo per sviluppare la loro immunobiologia e ha consentito di rilevare complessità insospettite nella loro interazione con molecole agoniste.

Recettori solubili

I recettori accoppiati a G proteine, caratterizzati da una struttura a 7 domini transmembrana, non possono dar luogo né possono essere ingegnerizzati a costituire molecole solubili che leghino con buona affinità gli agonisti. Perciò, la discussione dei recettori solubili è ristretta ad altre classi recettoriali. In teoria, i recettori solubili per fattori polipeptidici quali le citochine dovrebbero mantenere la specificità per il ligando tipica dei recettori associati alla membrana plasmatica come pure la loro affinità, senza essere riconosciuti come estranei dal sistema immunitario e quindi senza suscitare la produzione di anticorpi bloccanti. D'altra parte, ancora su un piano teorico generale, svantaggi importanti dei recettori solubili sono la loro clearance rapida e la loro rapida emivita nel sangue circolante. Per ovviare a questa limitazione i recettori solubili sono stati accoppiati con la porzione Fc delle immunoglobuline di classe IgG (spesso IgG1) che conferiscono una emivita lunga in generale dell'ordine di molti giorni. Inoltre, le proteine di fusione tra recettori solubili e immunoglobuline sono divalenti, avendo così una maggiore avidità quando interagiscono con agonisti che sono anche espressi in forma transmembrana. È questo il caso, ad esempio, del fattore di necrosi tumorale (TNF) che, prima di essere secreto, è espresso come una proteina di tipo 2 transmembrana.

La generazione di recettori solubili è parte dei meccanismi omeostatici dell'azione di fattori di crescita e citochine. Perciò la comprensione della fisiopatologia dei recettori solubili è fondamentale allo scopo di comprenderne lo sfruttamento farmacologico.

■ I recettori virali per citochine come paradigma

Nel loro rapporto evolutivo con gli organismi, i virus hanno sviluppato strategie di regolazione e controllo dei sistemi di comunicazione e in particolare delle citochine infiammatorie. Nella loro evoluzione i virus si comportano come "pirati molecolari" che catturano, adattano e utilizzano recettori cellulari per sovvertire i sistemi di comunicazione e difesa.

I virus costituiscono un paradigma della capacità in vivo dei recettori solubili per citochine di modulare la funzione di queste molecole. Molti virus, in particolare i virus della famiglia dei pox virus, hanno catturato nella loro evoluzione i geni che codificano per recettori per citochine e li utilizzano per sovvertire le risposte infiammatorie e immunologiche dell'ospite. La pirateria virale delle citochine e dei loro recettori costituisce una strategia diffusa che comprende la presenza nel genoma di virus di geni che codificano per citochine immunosoppressive (ad esempio, IL-10, virus di Epstein Barr), recettori solubili per citochine e molecole che legano citochine nonché recettori transmembrana per citochine (Tabella 17.1). Perciò, mentre gli studi sui recettori solubili delle citochine suggeriscono che queste molecole possono avere un ruolo complesso che comprende la presentazione dell'agonista a molecole che segnalano il prolungamento dell'emivita dell'agonista e la sua protezione, gli esperimenti condotti da "madre natura" con i virus suggeriscono che, almeno per citochine come IL-1, TNF e gli interferoni, i recettori solubili per citochine costituiscono un meccanismo di regolazione negativa dell'azione di queste molecole.

■ I recettori "decoy" sono trappole molecolari per gli agonisti

I recettori decoy costituiscono una strategia generale per regolare l'azione di citochine e fattori di crescita (Figura 17.1). La definizione di recettore fu coniata alla fine del

XIX secolo da Langley e comprende il riconoscimento di un ligando, di regola con alta specificità e affinità, assieme all'essere parte di un complesso recettoriale che dà segnale (la risposta). Riconoscimento e risposta sono dunque due elementi che caratterizzano la definizione classica di recettore. I recettori decoy costituiscono una deviazione da questo paradigma classico. Infatti, i recettori decoy sono molecole "recettoriali" che nascono per intrappolare il ligando e/o componenti essenziali della cascata di trasduzione del segnale attivata dal recettore. Si tratta cioè di specchietti per le allodole (decoys) che fungono da trappole molecolari per gli agonisti o per componenti fondamentali della trasduzione del segnale. Risultati recenti suggeriscono che queste molecole svolgono entrambe queste funzioni. I recettori decoy differiscono dalle versioni solubili di recettori che segnalano, in quanto nascono a questo scopo, nel senso genetico del termine: sono cioè codificati da geni appositi la cui unica funzione è quella di costituire un circuito di regolazione negativo di citochine e fattori di crescita.

Il paradigma dei recettori decoy fu formulato in origine per il recettore di tipo II di interleuchina-1 (IL-1) (Figura 17.1). Questo recettore, in forma associata alla membrana o in forma libera, rilasciata nei liquidi biologici, da solo o complessato con una proteina accessoria *Accessory Protein* (AcP) lega IL-1 β e IL-1 α e impedisce loro di riconoscere il recettore che segnala costituito dalle due catene IL-1RI e AcP. È interessante notare come il recettore di tipo 2, o decoy di IL-1, riconosca le due molecole con attività agonista ma non riconosca la molecola con attività antagonista della IL-1, il receptor antagonist (IL-1 α). Giova ricordare che quest'ultimo è oggi un farmaco approvato per uso clinico. In questo modo i due sistemi di regolazione negativa di IL-1 non si elidono reciprocamente bloccando uno le molecole agoniste (il decoy receptor) l'altro il recettore (IL-1 α). Inoltre, il recettore decoy di IL-1 funge anche da dominante negativo, nel senso che forma un complesso molecolare assieme alla proteina accessoria e all'agonista. In questo modo, il recettore decoy sottrae la proteina accessoria alla formazione di un complesso molecolare che segnala.

Il paradigma dei recettori decoy è stato successivamente esteso ad altri membri della famiglia di IL-1 e ad altre citochine e fattori di crescita. Infatti, nella famiglia di IL-1, esiste un recettore decoy (IL-18 binding protein) per interleuchina-18. Inoltre, esistono recettori decoy nella grande famiglia dei recettori per TNF (ad esempio, l'osteoprotegerina) nella famiglia dei recettori per IL-10, nella famiglia dei recettori per IL-4 e IL-13 (IL-13 α 2) e nella famiglia di TGF β . In conclusione, i recettori decoy che, ripetiamolo, differiscono dai semplici recettori solubili in quanto sono nati geneticamente per svolgere esclusivamente la funzione di trappola molecolare, costituiscono una strategia generale di regolazione della funzione di citochine infiammatorie e di alcuni fattori di crescita. Più recentemente si è scoperto che esistono recettori a sette domini transmembrana atipici, che non danno segnali di attivazione convenzionale. In particolare, il recettore D6 costituisce un decoy e scavenger per

TABELLA 17.1 Recettori per citochine di origine virale

Proteina	Virus	Specificità
B15R	Vaccinia	IL-1 β , non IL-1 α , IL-1 α
T2	Shape papilloma	TNF α e β
TNFR (rabbit)	Myxoma	TNF α e β
B28R	Vaccinia	TNF α e β
crmB	Cowpox	TNF α e β
G2R/G4R	Variola	TNF α e β
M-T7	Myxoma	IFN γ , chemochine
B8R	Vaccinia	IFN γ
B18R ⁺	Vaccinia	IFN α / β
US28	CMV	CC chemochine*
ECRF3	Herpes Virus Saimiri	CC chemochine
KSV-GPCR	KSV/HHV8	CC chemochine**

+ Rilasciato e di membrana
* Di membrana, trasducente segnale
** Costitutivamente attivo, induce proliferazione

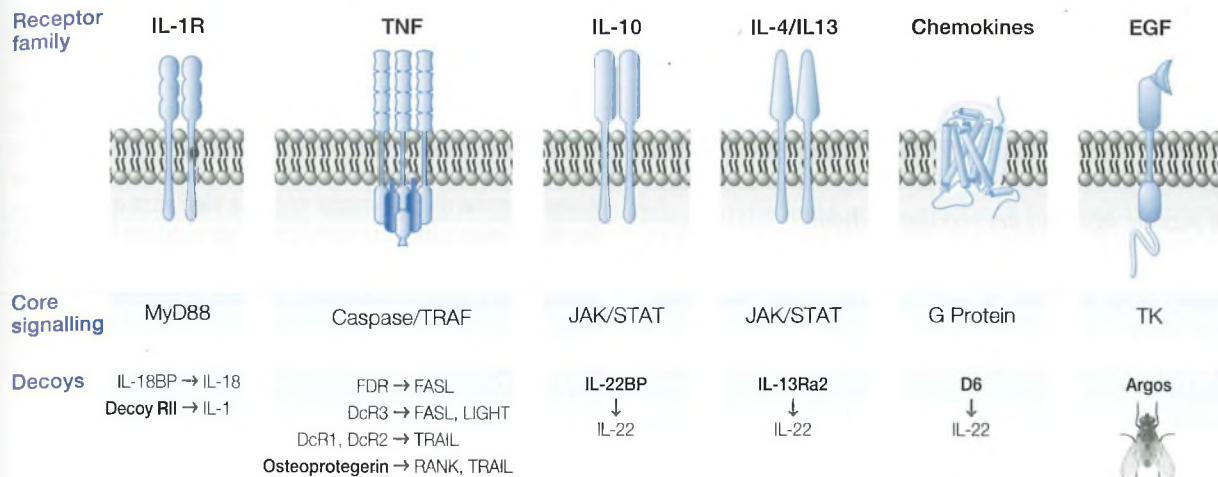


FIGURA 17.1 Recettori decoy appartenenti a diverse famiglie di citochine e fattori di crescita. (Da: Mantovani A et al. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. Trends Immunol 2001;22:328-36, modificata)

chemochine infiammatorie (Figura 17.1). Ancora, sono stati scoperti recettori decoy in *Drosophila melanogaster*. Si deve perciò concludere che i recettori decoy costituiscono una strategia generale per regolare l'azione di citochine e fattori di crescita conservata nell'evoluzione: l'uso farmacologico dei recettori solubili utilizza, cioè, una strategia di regolazione fisiopatologica.

■ Meccanismi di generazione dei recettori solubili

Le forme solubili dei recettori che segnalano vengono prodotti attraverso meccanismi diversi, che comprendono la produzione di splicing alternativo dei trascritti di mRNA che dà luogo a trascritti che codificano per la forma solubile, il taglio proteolitico oppure la liberazione dalla membrana grazie all'azione della fosfolipasi C. Nella tabella 17.2 sono riassunti i vari meccanismi e il loro ruolo nella generazione di forme solubili di meccanismi diversi. Lo splicing alternativo dà luogo a forme solubili dei recettori attraverso meccanismi diversi. La strategia più semplice per generare recettori solubili è costituita dall'esclusione dell'esone che codifica per la porzione transmembrana del recettore, e questo è il caso ad esempio per la catena α del recettore per il fattore di crescita GM-CSF. Un secondo meccanismo coinvolge l'inclusione nel trascritto maturo di un "esone solubile" che causa l'arresto della catena peptidica prima dell'esone

transmembrana. Perciò in verità, in queste condizioni, le forme di membrana del recettore sono in realtà il risultato dello splicing alternativo. Questo tipo di meccanismo è utilizzato per generare i recettori solubili di IL-4 e IL-5 e *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF).

Il rilascio mediato da enzimi proteolitici è coinvolto nella generazione di forme solubili dei recettori di TNF di tipo 1 (o p55) e di tipo 2 (o p75) nonché del recettore decoy di IL-1 e della catena α del recettore di IL-2. Per quanto riguarda la catena α del recettore di IL-6, questa può essere rilasciata sia da azione di enzimi proteolitici come pure mediante splicing alternativo. Enzimi che causano taglio proteolitico e rilascio o shedding del recettore di membrana sono stati solo in parte caratterizzati. È interessante notare come l'enzima di conversione di TNF (TACE) appartenente alla famiglia ADAM (ADAM17) oltre a rilasciare TNF dalla membrana causi anche rilascio dei recettori stessi. In generale, giocano un ruolo fondamentale nel rilascio di recettori di membrana enzimi appartenenti alla famiglia delle metalloproteasi di matrice (MMP).

■ Effetti antagonisti dei recettori solubili

Praticamente tutti i recettori solubili per citochine e fattori di crescita, anche quelli che hanno una affinità relativamente bassa rispetto ai recettori di membrana, possono inibire in vitro il legame e l'attività biologica di citochine e fattori di crescita. Così, in generale, l'interazione di un recettore solubile con il suo agonista impedisce il legame a un recettore di membrana funzionale e quindi blocca il segnale e le risposte successive. I recettori solubili perciò da questo punto di vista bloccano l'azione di citochine e fattori di crescita in modo competitivo, e il loro effetto inibitorio dipenderà dalla concentrazione relativa dei recettori solubili dei fattori di crescita o citochine agonistiche nonché di quelle antagonistiche (ad esempio, IL-1 vs IL-1 α) come pure dalle loro affinità relative. Tuttavia, come discusso in precedenza, almeno alcuni recettori

TABELLA 17.2 Meccanismi di generazione dei recettori solubili per citochine

Taglio proteolitico	Fosfolipasi	Splicing alternativo
TNF, RI e II IL-1 RII IL-2R α IL-6R α M-CSFR(fms) c-kit	CNTFR	IL-4R α IL-5R α GM-CSFR α IL-7R IL-9 LIF-R IFN α / β R c-kit

decoy (IL-1, IL-18) si comportano come dominanti negativi, sottraendo cioè componenti essenziali del complesso recettoriale che segnala (nel caso di queste molecole, le proteine accessorie). Perciò, l'effetto di queste molecole è superiore a quello atteso sulla base di una attività di tipo semplicemente competitivo.

■ Azione agonista dei recettori solubili

Se è vero che in generale i recettori solubili si comportano come degli inibitori, vi sono però eccezioni importanti. Le catene α di almeno alcuni membri della famiglia di IL-6, anche quando presenti in forma solubile, legano l'agonista e lo presentano alla catena GP130 che attiva la trasduzione del segnale (Figura 17.2). Questo fenomeno è detto di trans-signalling. Inoltre, almeno in alcune condizioni sperimentali si osservano fenomeni paradossali per cui i recettori solubili di alcune citochine potenziano la loro attività. Questo avviene per meccanismi diversi, legati a un prolungamento dell'emivita dell'agonista (è questo il caso di TNF) o a una protezione dalla digestione

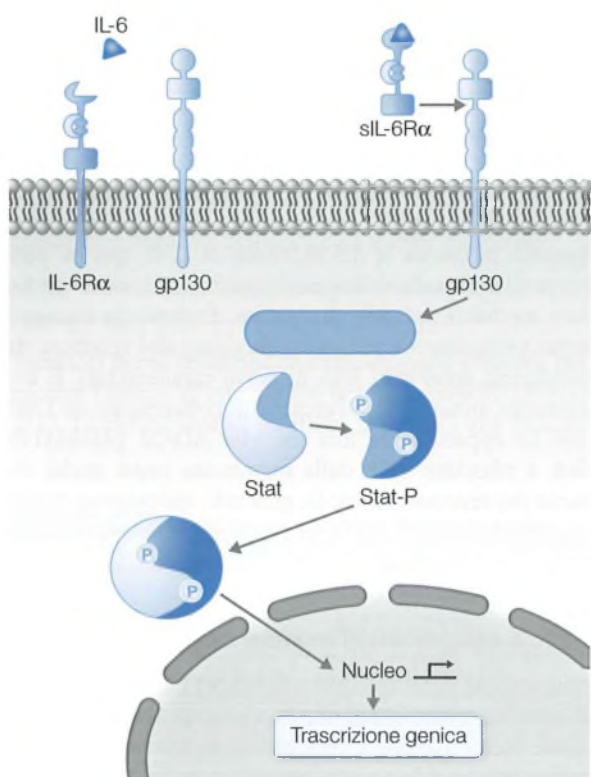


FIGURA 17.2 Interazione di IL-6 con i suoi recettori. IL-6 può interagire con un recettore di membrana costituito da due subunità, gp130 e IL-6R α . IL-6R α "presenta" l'agonista alla catena gp130 che dà origine alla segnalazione intracellulare attivando Stat (trans-signalling). IL-6 può interagire anche con un recettore solubile di IL-6 (sIL-6R α) presente nel plasma che viene così presentata alla catena gp130 e può dare origine al transsignalling. Questo avviene, ad esempio, a livello delle cellule endoteliali dove gp130 cooperando con la forma solubile di IL-6R α può trasdurre il segnale intracellulare IL-6-dipendente anche se queste cellule non hanno IL-6R α . Questo è importante per l'attivazione dell'endotelio vascolare e per la transizione da infiammazione acuta a cronica.

da enzimi proteolitici. In conclusione i recettori solubili per citochine e fattori di crescita possono avere effetti divergenti sull'attività biologica di queste molecole. La loro funzione fisiopatologica in vivo può essere illustrata con l'immagine di una bilancia: da una parte questi recettori possono inibire l'interazione con i recettori che segnalano e comportarsi da dominanti negativi; dall'altra queste molecole possono in certe condizioni aumentare la stabilità e prolungare l'emivita degli agonisti. In generale, l'effetto prevalente è di tipo inibitorio. Tuttavia, il concetto generale che i recettori solubili per citochine o fattori di crescita possano avere un'influenza divergente sulla funzione di queste molecole ha implicazioni per la comprensione della loro funzione in vivo e della loro farmacologia.

■ Recettori solubili come agenti farmacologici

Da un punto di vista farmacologico, i recettori solubili possono essere utilizzati o in quanto tali nelle loro varie forme e modificazioni biotecnologiche, o rappresentare bersaglio per l'azione di agenti che ne aumentino la produzione. Un esempio importante di questa seconda prospettiva è costituito dal recettore decoy per IL-1. L'espressione genica e la produzione di questa molecola sono fortemente aumentate da segnali antinfiammatori quali alcune citochine e in particolare gli ormoni glucocorticoidi. In particolare, gli ormoni glucocorticoidi in vitro e in vivo, nell'animale e nell'uomo, aumentano produzione e rilascio del recettore decoy per IL-1. È probabile che l'aumentata produzione del falso recettore di IL-1 costituisca uno dei meccanismi attraverso cui gli ormoni glucocorticoidi esercitano la loro funzione antinfiammatoria.

Recettori solubili per citochine e fattori di crescita costituiscono potenziali agenti terapeutici con la capacità di inibire l'attività di questi mediatori endogeni. Se confrontato con la strategia di blocco basata sull'uso di anticorpi monoclonali, i recettori solubili per citochine hanno affinità comparabile per le molecole agonistiche e presentano il vantaggio teorico di non essere riconosciuti come non-self dal sistema immunitario. Il principale problema legato all'uso di recettori solubili come farmaci è la loro emivita relativamente breve in vivo, che di regola non supera le poche ore. In contrasto, gli anticorpi monoclonali hanno ovviamente un'emivita che è dell'ordine di molti giorni, di diversi ordini di grandezza superiore a quella dei recettori solubili. La costruzione di proteine di fusione fra recettori solubili e la porzione Fc di una immunoglobulina ha aggirato questo limite intrinseco dei recettori solubili. Il vantaggio di queste molecole ibride è costituito da un'aumentata emivita, simile a quella degli anticorpi. Inoltre, la natura dimerica dei costrutti recettoriali ibridi dal punto di vista di principio conferisce una superiore avidità per agonisti legati alla membrana, quali ad esempio la forma di 26 kd transmembrana di TNF, che è biologicamente attiva o, più in generale, nei confronti di agonisti multimerici solubili.

I recettori solubili di TNF hanno costituito il primo esempio della trasformazione di una molecola di questo tipo in un farmaco attivo in patologia umana. Alla fine degli anni 80, diversi gruppi avevano scoperto che l'urina

umana conteneva proteine inibitorie di TNF. Utilizzando diverse centinaia di litri di urina umana, questo inibitore fu purificato e sequenziato in Israele e si dimostrò essere una proteina che lega TNF. Quindi questa proteina, denominata *TNF Binding Protein* (TBP) si è rivelata essere la forma solubile dei due recettori di membrana di TNF, tipo 1 e tipo 2 (p55 e p75). Sono state successivamente costruite proteine di fusione che combinano i recettori solubili di TNF con la parte costante della catena pesante delle immunoglobuline, con lo scopo principale di ottenere un prolungamento dell'emivita in vivo. Le proteine di fusione dei recettori di TNF hanno dimostrato attività antinfiammatoria e immunosoppressiva in una varietà di modelli preclinici di infiammazione locale e sistemica. Le proteine di fusione Fc-TNF recettore di tipo 2 sono ora approvate per uso clinico. In particolare, queste proteine di fusione si sono rivelate attive nei confronti dell'artrite reumatoide, dell'artrite reumatoide giovanile e di altre patologie immunoinfiammatorie.

Anticorpi monoclonali

Alla fine del diciannovesimo secolo, Kitasano e von Behring hanno condotto un lavoro pionieristico sull'uso di antisieri diretti contro la tossina difterica, stabilendo così il principio che gli anticorpi possono essere utilizzati come inibitori di sostanze tossiche esogene o endogene. Gli anticorpi costituiscono dunque una strategia classica e ovvia per inibire mediatori tossici di origine esogena o endogena. La scoperta della tecnologia degli anticorpi monoclonali e più in generale delle tecniche biotecnologiche di ingegnerizzazione delle molecole anticorpali ha aperto nuove vie per l'uso degli anticorpi come agenti bloccanti.

La scoperta degli anticorpi monoclonali risale alla seconda metà degli anni 70, ma la loro traduzione clinica in agenti farmacologici efficaci nell'uomo ha dovuto attendere gli anni 90. Il principale vantaggio teorico degli anticorpi rispetto ad esempio ai recettori solubili naturali allo scopo di bloccare l'azione di citochine o fattori di crescita, è la loro lunga emivita nei liquidi biologici. Inoltre, è facile ottenere con gli anticorpi monoclonali molecole con affinità estremamente elevata. Lo svantaggio, d'altra parte, delle molecole anticorpali come agenti bloccanti è la loro capacità di fungere da antigeni essi stessi e generare anticorpi endogeni inibitori. Questo limite è solo in parte superato dall'utilizzo di tecnologie di umanizzazione, in quanto è possibile sempre la produzione di anticorpi diretti contro le parti variabili degli anticorpi inoculati in grandi quantità come farmaci.

Diverse forme di ingegnerizzazione sono state utilizzate per minimizzare l'antigenicità delle molecole anticorpali. Queste comprendono la costruzione di molecole chimeriche che consistono della regione costante delle immunoglobuline umane accoppiata con il frammento variabile FV della regione dell'anticorpo monoclonale di topo. Ancora, sono possibili tecniche di umanizzazione più estensiva. Infatti, è possibile trapiantare le sequenze

delle regioni che determinano la complementarità (CDR) delle catene immunoglobuliniche di topo all'interno dei geni che codificano catene immunoglobuliniche umane. Gli anticorpi che si ottengono in questo modo consistono per più del 95% di sequenze umane con una piccola porzione di sequenze murine. Ancora, è possibile produrre anticorpi monoclonali interamente umani o utilizzando tecnologie di tipo cellulare "classiche" o utilizzando anticorpi ricombinanti prodotti in batteri. Questi sono di regola anticorpi a catena singola (single chain, frammento variabile, scFv). Infine, utilizzando topi geneticamente modificati, è possibile produrre a partire da topi immunizzati anticorpi monoclonali umani. Al momento attuale, gli anticorpi murini, anticorpi ibridi o gli anticorpi umanizzati dominano il settore dell'uso farmacologico degli anticorpi monoclonali.

Nella tabella 17.3 sono elencati alcuni degli anticorpi monoclonali approvati per uso farmacologico nell'uomo. Come si vede, gli anticorpi monoclonali si sono rivelati una strategia farmacologica utile in settori diversi, che vanno dalla terapia di alcuni tumori, in particolare linfomi (ad esempio, anticorpi anti CD20), a strategie di immunosoppressione (anticorpi anti CD3 e ancora anticorpi anti CD20), al blocco delle citochine infiammatorie, in particolare TNF, IL-6 e IL-1. In particolare, la dimostrazione che gli anticorpi TNF avevano un effetto terapeutico nei pazienti con artrite reumatoide e con malattia infiammatoria intestinale tipo morbo di Crohn ha avuto un ruolo cruciale nello stimolare lo sviluppo di strategie anticitochine basate sul recettore solubile o su anticorpi monoclonali in patologia umana. Si può dunque affermare che il settore dell'uso terapeutico degli anticorpi, dopo la sua nascita come strategia di blocco delle tossine esogene alla fine del diciannovesimo secolo con Kitasano e Behring, stia vivendo un autentico Rinascimento, in cui in particolare queste molecole vengono utilizzate per bloccare cellule o mediatori (citochine o fattori di crescita) che costituiscono in condizioni patologiche delle "tossine" endogene.

TABELLA 17.3 Alcuni anticorpi monoclonali approvati per uso clinico

Anticorpo	Molecola riconosciuta	Patologia
Trastuzumab	HER-2	Carcinoma della mammella (2 ^a linea)
Alemtuzumab	CD52	B-CLL (2 ^a linea)
Rituximab	CD20	Linfoma non-Hodgkin
Basiliximab	IL-2R	Rigetto dei trapianti
Palivizumab	RSV	RS virus nei bambini
Daclizumab	IL-2R	Rigetto dei trapianti
Infliximab	TNF- α	Morbo di Crohn, artrite reumatoide
Bevacizumab	VEGF	Tumori e patologie dell'occhio

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I recettori decoy dissociano le due caratteristiche classiche di un recettore: riconoscimento del ligando e segnale.
- ▶ I recettori decoy intrappolano il ligando e a volte formano complessi con elementi essenziali del recettore, comportandosi da dominante negativo della funzione di segnalazione del recettore stesso.
- ▶ Gli anticorpi monoclonali costituiscono una strategia di intervento terapeutico essenziale in patologie diverse, soprattutto in ambito neoplastico e autoimmune.

Bibliografia essenziale

- ▶ Hansel TT, Kropshofer H, Singer T et al. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discovery* 2010;9:325-38.
- ▶ Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 2006;6:907-18.
- ▶ Mantovani A, Savino B, Locati M et al. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:27-39.
- ▶ Mantovani A, Dinarello CA, Ghezzi P. Pharmacology of cytokines. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- ▶ Taylor PC. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10:308-15.

SEZIONE

4

Le cellule come farmaci

CAPITOLO 18

Medicina rigenerativa e terapia genica

Luciano Conti, Elena Cattaneo

4

Medicina rigenerativa e terapia genica

CAPITOLO

18

Luciano Conti, Elena Cattaneo

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le nozioni di base sulle varie tipologie di cellule staminali, le loro relative proprietà biologiche
- ▶ Acquisire le conoscenze di base sulle molteplici opportunità applicative delle cellule staminali proposte e realizzate a oggi per le terapie in ambito ematologico, epiteliale, cardiovascolare, muscolare e delle malattie neurodegenerative
- ▶ Acquisire i concetti di base riguardante gli aspetti normativi e di produzione dei prodotti medicinali a base di cellule
- ▶ Acquisire le nozioni teoriche e pratiche sulla terapia genica per la cura di malattie monogeniche e dei tumori

Il concetto di terapia cellulare nasce alla fine degli anni 50 a seguito del primo trapianto di midollo osseo effettuato da un oncologo francese, Georges Mathé. Egli trapiantò del midollo osseo in sei tecnici jugoslavi esposti a grosse dosi di radiazioni nucleari che avevano compromesso il loro midollo osseo. Negli anni seguenti, la tecnica del trapianto di midollo venne affinata nella clinica grazie agli studi condotti da Edward Donnall Thomas che dimostrò come le cellule del midollo osseo, una volta infuse per via endovenosa, erano in grado di ripopolare il midollo dell'ospite e produrre nuove cellule del sangue. Nel 1990, questi studi valsero a Edward Donnall Thomas (in condivisione con Joseph Murray, autore del primo trapianto di rene nel 1954) il premio Nobel per la Medicina. Da allora sono decine di migliaia i malati di leucemie o di immunodeficienze curati grazie al trapianto di midollo.

L'utilizzo delle cellule come farmaci nell'ultimo decennio ha trovato sempre più spazio nella clinica per il trattamento anche di patologie che colpiscono tessuti differenti da quello ematico, con ottimi successi per quanto riguarda pelle e cornea. Quali possano essere i successivi ambiti e le malattie che vedranno, nella terapia cellulare, un valido supporto clinico resta difficile da prevedere così come è impossibile pronosticare quale staminale potrà essere più curativa. Tuttavia, la speranza è che una migliorata conoscenza delle caratteristiche biologiche e della trattabilità di diverse tipologie di cellule staminali possa sfociare in nuove prospettive terapeutiche per le malattie cardiache, il diabete, la distrofia muscolare e alcune malattie neuro-

logiche. Al fine di poter realizzare questo importante e ambizioso traguardo, è tuttavia necessario che la richiesta di cura da parte dei malati trovi sempre conforto nelle evidenze sperimentali precliniche e garantisca sicurezza per i pazienti.

Principi di medicina rigenerativa

Negli ultimi decenni, la medicina trapiantologica ha fornito le basi pratiche per dimostrare in ambito clinico l'ottenimento di un ripristino terapeutico a seguito del trapianto di tessuti o di organi. Nonostante si sia dimostrato molto efficace in pazienti con leucemie refrattarie, insufficienze renali, cirrosi o gravi scompensi cardiaci, il trapianto, tuttavia, rimane un'opportunità terapeutica circoscritta a un numero limitato di pazienti, principalmente a causa dell'insufficienza di donazioni di organi e delle complicanze derivate dalle terapie immunosoppressive. Tali circostanze hanno promosso la ricerca di soluzioni alternative che, partendo dalla strategia tradizionale dell'utilizzo di tessuti da individuo donatore, portasse allo sviluppo della cosiddetta "medicina rigenerativa". Questo termine, oggi, identifica quindi quella branca della medicina il cui obiettivo è portare al recupero permanente dei tessuti e degli organi danneggiati sfruttando le potenzialità rigenerative delle cellule staminali. Gli avanzamenti della medicina rigenerativa sono quindi strettamente correlati ai progressi delle conoscenze sulla biologia delle cellule staminali.

Queste cellule esistono e funzionano fisiologicamente nei nostri tessuti. È a queste competenze che la ricerca e la medicina rigenerativa guardano con attenzione, con l'intento di implementarne le capacità a scopi trapiantologici. È infatti la loro elevata capacità proliferativa (di grado diverso a seconda della staminale in questione) e propensione a differenziare dando origine a tipi cellulari specializzati e a nuovi tessuti a fornire il "principio attivo" della terapia rigenerativa. Esse, isolate o purificate dal tessuto, poi espanse e "istruite" in laboratorio e infine trapiantate, potrebbero curare il danno tissutale in corso mediante la ricostruzione *de novo* dell'appropriata citoarchitettura cellulare. Potrebbero funzionare anche rilasciando ulteriori principi attivi (ad esempio, sostanze antinfiammatorie o fattori di crescita) e agire quindi da "minipompa biologica". Possono inoltre essere migliorate geneticamente, mediante correzione genica (qualora siano portatrici di un difetto genico) o aggiunta genica. Certamente il ripristino dei tessuti danneggiati mira a offrire un vantaggio terapeutico duraturo in condizioni che possono comprendere le patologie sia congenite che acquisite. Il risultato curativo dipenderà dalla capacità della popolazione di cellule staminali impiegata nell'assicurare il massimo grado di rigenerazione tissutale, e nella costituzione della nicchia tissutale nel contesto ambientale patologico che permetta l'instaurarsi del beneficio terapeutico.

Due sono quindi le strategie di intervento della medicina rigenerativa. Il primo prevede l'approccio *in vivo* che si basa sulla stimolazione farmacologica delle cellule staminali presenti nei tessuti di interesse al fine di aumentarne il potenziale riparativo. Il secondo approccio, *ex vivo*, mira al trapianto di cellule staminali, o progenitrici, espanse e/o modificate geneticamente *in vitro* che vadano a colonizzare il distretto di interesse e ne sostengano l'aspetto rigenerativo-riparativo. Nell'ambito di questo capitolo l'attenzione sarà focalizzata principalmente sugli aspetti di terapia cellulare in medicina rigenerativa e in terapia genica, tralasciando le strategie *in vivo* in quanto ancora difficili da immaginare a scopo terapeutico per la maggior parte delle malattie.

Definizione e principali tipologie di cellule staminali

In generale, una cellula staminale è una cellula immatura che presenta due caratteristiche principali che la distinguono dalle altre cellule:

1. l'auto-rinnovamento (o *self-renewal*), ossia la proprietà per la quale le cellule sono in grado di riprodurre se stesse conservando il loro grado di immaturità;
2. il potenziale differenziativo, inteso come la capacità di una singola cellula di dare origine a una progenie che comprende differenti tipi cellulari. In questo caso, si può evidenziare una vera e propria gerarchia delle potenzialità differenziative delle cellule (Figura 18.1).

Un'ulteriore definizione, ancora più rigorosa, è su base funzionale: una cellula staminale è tale quando è in grado di generare tutte le cellule del tessuto in cui si trova. An-

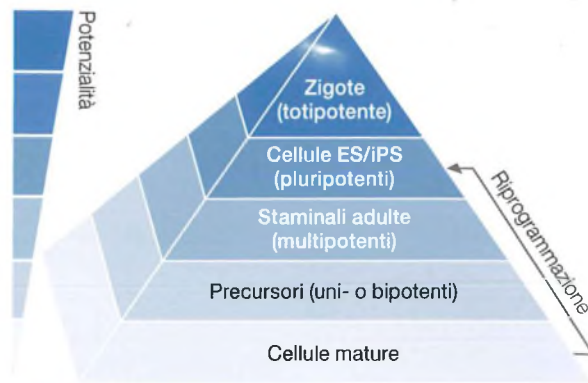


FIGURA 18.1 Gerarchia della potenzialità differenziativa delle cellule. In cima alla piramide si trova lo zigote, in grado di originare tutto un individuo completo, inclusi gli annessi embrionali. Le cellule staminali embrionali o le cellule iPS (derivate da processi di riprogrammazione) sono pluripotenti, potendo originare tutti i derivati dei tre foglietti germinativi. A seguire si trovano le cellule staminali adulte caratterizzate da uno stadio di multipotenza, potendo originare solo i derivati funzionali del tessuto di origine e i precursori, cellule ad attività proliferativa e differenziativa ristretta a uno o due tipi funzionali. Infine si trovano le cellule mature che, nei casi in cui possono dividersi, lo fanno soltanto per generare altre cellule mature uguali a quelle di origine.

cora una volta quindi, le staminali del sangue o della pelle si collocano ai vertici di questa classificazione in quanto aderiscono pienamente a questo requisito. Tuttavia, per la maggior parte degli altri tessuti e delle altre staminali, a oggi, questa dimostrazione funzionale manca o è incompatibile con il ruolo della staminale in questione (pensiamo ad esempio alla staminale del cervello).

Le cellule staminali vengono anche distinte in base alla loro comparsa temporale durante lo sviluppo (Tabella 18.1): esse si trovano infatti lungo tutto il corso dello sviluppo di un individuo e si presentano con un grado di plasticità differente che permette di classificarle in: totipotenti, pluripotenti, multipotenti.

Cellule totipotenti È lo zigote o la cellula allo stato di blastomero, in quanto elemento che può differenziare dando origine a un organismo completo. Si tratta di una cellula transiente non espandibile come tale.

Cellule staminali pluripotenti A questo gruppo appartengono due tipologie cellulari: le prime, presenti transientemente nella blastocisti, prendono il nome di cellule embrionali staminali (ES); le seconde, risultato di una recente scoperta che prevede una manipolazione in laboratorio, sono ottenute riprogrammando cellule mature adulte a cellule simil-ES. Diversamente dallo zigote, le cellule pluripotenti non possono differenziare in un organismo completo. Tuttavia mantengono un elevato potenziale differenziativo in quanto sono in grado di produrre i derivati dei tre foglietti germinativi (ectoderma, mesoderma ed endoderma) e quindi di generare staminali tessuto-specifiche oltre alle tipologie di cellule funzionalmente mature che da esse derivano: si tratta delle oltre 250 grosse tipologie di cellule presenti

TABELLA 18.1 Caratteristiche delle principali tipologie di cellule staminali

Tipologie di cellule staminali	iPS	ESC	Fetali	Adulte del sangue	Adulte della pelle	Adulte del cervello	Cordonali
Fonte	Cellule fetali e adulte immature e differenziate	Blastocisti	Tessuti fetali	Midollo osseo o sangue periferico	Pelle	Cervello	Cordone ombelicale
Potenzialità	Pluripotenti	Pluripotenti	Multipotenti	Multipotenti	Multipotenti	Multipotenti	Multipotenti
Espandibilità	Sì	Sì	A seconda del tessuto di origine	Limitata	Sì	Sì	No
Utilizzo clinico	Non ancora	Studi di fase I	Sì	Sì	Sì	Non ancora	Sì
Efficacia clinica	Non ancora	Non ancora	Sì	Sì	Sì	Non ancora	Sì
Manipolabilità genetica	Ottima	Ottima	Limitata	Limitata	Limitata	Limitata	Limitata
Criopreservazione	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Potenzialità tumorigenica	Sì	Sì	Alcuni casi	Non osservata	Non osservata	Non osservata	Non osservata

nel feto e nell'organismo adulto. Le cellule pluripotenti non possono generare cellule dei tessuti extraembrionali (trofoectoderma e placenta).

Cellule staminali multipotenti Sono le cellule staminali adulte e tessuto-specifiche (dette anche somatiche), presenti nei diversi tessuti del feto e dell'organismo adulto e in grado di differenziare solamente nei tipi cellulari del tessuto di cui fanno parte. Ad esempio la cellula staminale ematopoietica differenzia generando i principali tipi cellulari maturi che compongono il sangue. È importante sottolineare che le cellule staminali adulte (del sangue, della pelle, del muscolo, del sistema nervoso, del rene ecc.), sebbene raggruppate in un'unica tipologia, comprendono categorie e definiscono ambiti di ricerca ben distinti, in quanto a caratteristiche delle cellule, possibilità del loro isolamento ed espansione, potenzialità differenziativa e potenziali impieghi terapeutici.

Cellule staminali pluripotenti

Le origini del settore della biologia delle cellule staminali pluripotenti risalgono agli studi di Leroy Stevens, un biologo dello sviluppo che presso i laboratori della ditta Jackson scoprì l'insorgenza di tumori testicolari spontanei (teratocarcinomi) nel ceppo di topo 129. Cellule isolate dai teratocarcinomi maligni (denominate cellule EC o cellule di "carcinoma embrionale") potevano essere mantenute in vitro e, quando iniettate in embrioni precoci di topo (allo stadio di blastocisti), l'ambiente degli embrioni in sviluppo le indirizzava verso programmi differenziativi multipli. Il risultato finale era la nascita di topi chimerici in cui una parte significativa dell'animale derivava dalle cellule EC.

In seguito, nel 1981, Martin Evans e Matthew Kaufman riuscirono a coltivare in laboratorio le cellule ES isolate dalla massa cellulare interna (ICM) di blastocisti murine, generando appunto linee cellulari permanenti. Le cellule ES sono state adattate per crescere e quindi dividersi in vitro in assenza di cambiamento, pur mantenendo la

potenzialità di differenziarsi in cellule di mesoderma, endoderma ed ectoderma, qualora stimulate opportunamente. In quanto cellule staminali pluripotenti, una volta reintrodotte nelle blastocisti poi reimpiantate in topi femmine rese pseudogravide, le cellule ES partecipano attivamente alla formazione di tutti i tessuti di un embrione. La loro capacità di originare chimere viene sfruttata come prova dimostrativa della reale pluripotenza di una popolazione cellulare. È importante sottolineare che le cellule ES murine tuttavia non contribuiscono ai tessuti extraembrionali, a indicare il loro potenziale più ristretto rispetto allo zigote. Un'altra caratteristica peculiare delle cellule ES murine è la loro capacità di formare teratomi, una volta iniettate in topi immunodeficienti. Si tratta di tumori benigni che contengono svariati tipi di cellule, alcune altamente differenziate, altre parzialmente indifferenziate, provenienti da differenti foglietti germinali, segno del loro multiforme potenziale differenziativo.

Diciassette anni dopo l'isolamento delle ES di topo, nel 1998, James Thomson e colleghi pubblicano su *Science* la derivazione di linee cellulari staminali embrionali a partire da blastocisti umane (sovranumerarie) attraverso una procedura che, per ottenere le cellule di interesse, ne provocava la distruzione. Questa pubblicazione espose da subito governi e società a nuovi interrogativi destinati ad alimentare un dibattito etico su cosa fosse una blastocisti, una persona umana come chi scrive e chi legge, o solamente una struttura multicellulare in vitro della dimensione inferiore a un mm. Dal punto di vista strettamente legislativo, il panorama mondiale riflette questa varietà di posizioni dei diversi Stati e dei loro cittadini. In nazioni, come la Gran Bretagna, il Belgio o la Svizzera, è possibile derivare linee di cellule ES umane da blastocisti sovranumerarie. In altri Stati, come la Germania, solo linee prodotte entro una data prestabilita possono essere impiegate in ricerca (la Germania sta recentemente passando una legge per posporre questo limite – dapprima stabilito nell'anno 2002 – spostandolo al 2007). Altri Stati, come l'Italia, impediscono la derivazione di nuove linee

ma non l'impiego di linee già derivate che possono quindi essere ottenute e importate nell'ambito di progetti di collaborazione internazionali. Infine, una quarta tipologia è rappresentata dalla posizione tenuta da Paesi come gli Stati Uniti nei quali per anni, durante l'amministrazione Bush, la ricerca sulle linee embrionali prodotte dopo il 2002 non poteva giovare del finanziamento pubblico. Tuttavia, la ricerca sulle cellule ES umane non veniva impedita sul suolo americano, potendo così procedere grazie al finanziamento privato di fondazioni e cittadini e giungendo a importanti scoperte (come le cellule iPS). L'interesse verso le cellule ES umane risiede nel fatto che, come la loro controparte murina, esse hanno il potenziale di differenziare in tutti i tipi cellulari (a esclusione dei derivati extraembrionali) del corpo umano, fetale e adulto. In laboratorio, le cellule ES umane sono state differenziate in cellule epidermiche, adrenosurrenali e cheratinociti, ma anche in cellule dell'endotelio, del rene, dell'osso, del muscolo e del cuore, del pancreas e del fegato, anche se l'efficienza di queste conversioni non è totale. È stato anche riportato il differenziamento di cellule ES umane in cardiomiociti e in neuroni elettrofisiologicamente maturi, comparabili con quelli presenti normalmente in vivo. I dati finora ottenuti indicano che questa capacità differenziativa non è emulabile con staminali adulte. Studi in modelli animali hanno inoltre dimostrato che il trapianto di cellule derivate da cellule ES umane può trattare con successo alcune malattie congenite, incluse malattie cardiovascolari e diabete, o danni da traumi a carico del midollo spinale, il che sottolinea ancora una volta le potenzialità di utilizzo delle cellule ES nella rigenerazione tissutale e nella medicina moderna, anche se il rischio dell'insorgenza di teratomi non è da sottovalutare e rappresenta uno degli aspetti in studio. Per evitare questo rischio, la ricerca odierna su queste cellule mira a trapiantare derivati delle cellule ES già specializzati. A oggi due sperimentazioni cliniche sono state autorizzate dalla FDA basate su cellule ES umane. È anche importante sottolineare che gli obiettivi della ricerca sulle cellule ES si estendono anche ad altri ambiti, quali la tossicologia, lo studio di farmaci, e alla possibilità di impiegare queste cellule per capire meccanismi di malattia o la fisiologia dello sviluppo embrionale umano.

Uno dei recenti traguardi della ricerca sulle cellule ES umane è rappresentato dalla scoperta di una nuova e affascinante cellula: la cellula staminale pluripotente indotta (iPS, vedi **CD**: Approfondimento 18.1. *Storia e sviluppi della ricerca sulle cellule iPS*).

L'avvento della tecnologia delle cellule iPS ha rappresentato un altro formidabile giro di boa nel campo della biologia delle cellule staminali, aprendo enormi prospettive per l'utilizzo di queste cellule staminali in ambito clinico. Esse infatti associano la pluripotenza e la potenzialità differenziativa delle cellule ES al fatto di potere essere ottenibili dall'individuo stesso e quindi, teoricamente, fatti salvi i rischi associati allo stato di pluripotenza cellulare sopra descritti, permetterebbero lo sviluppo di terapie cellulari personalizzate basate sull'impianto di cellule iPS ottenute dai propri fibroblasti e successivamente istruite a generare i sottotipi di cellule specializzate di interesse.

Cellule staminali multipotenti o adulte

Molti tessuti del nostro corpo sono popolati da cellule staminali. Queste lavorano fisiologicamente per garantire il ricambio cellulare necessario al mantenimento della funzionalità dell'organo stesso. La loro abbondanza e attività nei vari tessuti è tuttavia molto differente e in generale si può dire che le staminali sono tanto più abbondanti in un tessuto quanto maggiore è la sua capacità (e necessità) rigenerativa. Ad esempio, le già citate staminali che generano i derivati specializzati del sangue sono staminali "professioniste" in quanto ogni giorno il midollo osseo deve produrre 2,5 miliardi di eritrociti, 2,5 miliardi di piastrine e 1 miliardo di leucociti per kg di peso corporeo per sostituire quelle "usurate". Un altro tessuto ricco in staminali è l'epidermide la quale, ogni minuto, perde (e deve rigenerare) 30×10^3 cellule del suo strato più superficiale per permettere al nostro organismo di vivere. Ai poli estremi vi sono le staminali del cervello. Solo più recentemente riconosciute, queste cellule, localizzate in due aree del cervello, l'ippocampo e la zona sottoventricolare, sono numericamente esigue e poco attive. A fronte dei circa 100 miliardi di neuroni presenti in un cervello adulto, una stima approssimativa parla di una perdita di circa 85×10^3 cellule sottocorticali al giorno che non vengono sostituite. Anche se i fattori e i processi che governano il potenziale differenziativo delle cellule staminali derivate da tessuto non sono ancora ben noti, c'è una crescente attenzione all'isolamento, alla caratterizzazione e al potenziale terapeutico di queste staminali residenti nei tessuti adulti, allo scopo di ripararli e rigenerarli. Queste infatti sono di più facile accesso delle embrionali e, per alcune di esse le cui applicazioni non richiedono una forte espansione in vitro, la capacità differenziativa resta notevole. Un esempio emblematico è rappresentato dalle cellule staminali ematopoietiche (*Hematopoietic Stem Cell*, HSC), probabilmente le cellule staminali adulte meglio conosciute, che sono state oggetto di profonde ricerche di base e cliniche. Le HSC possono essere isolate in modo prospettico (con anticorpi specifici), quindi arricchite e utilizzate in trapianti sia di tipo autologo che allogenico per il trattamento di pazienti con immunodeficienze ereditarie, malattie autoimmuni o altre malattie a carico del sistema ematopoietico.

Da un punto di vista temporale, tra le cellule ES e quelle adulte si collocano le cellule staminali fetali. Anche esse sono definite multipotenti e adulte in quanto presenti nei tessuti già specializzati. Si pensa che le cellule staminali ottenute da sangue e tessuti fetali abbiano proprietà e immunofenotipo simili a quelli delle cellule staminali isolate da tessuto adulto. Le ricerche finora condotte suggeriscono che le cellule staminali fetali siano più plastiche delle cellule staminali adulte e quindi possano avere un potenziale terapeutico maggiore. Negli ultimi anni il sangue da cordone ombelicale ha attirato l'interesse come sito alternativo di cellule multipotenti da impiegarsi nella medicina rigenerativa. Anche la placenta, che è coinvolta nel processo di mediazione della tolleranza fetale, contiene cellule che possiedono proprietà immunomodulatorie. Queste due caratteristiche possono dimostrarsi fondamen-

tali pe
è appl
stann
applic
in mo
cellul
eccez
trapia
uno c
illimi
gli ab
scita

Pro
a b

Le
farm
una
attr
sici
con
Neq
div
rip
del
gui
cel
na
di
ge
in
le
er
e
n
c
l
z
(

tali per future applicazioni cliniche. Un discorso simile è applicabile per le cellule staminali mesenchimali che stanno raccogliendo sempre più interesse come cellule per applicazioni terapeutiche. È bene ricordare tuttavia che, in molti casi, i protocolli di ottenimento ed espansione di cellule staminali adulte non sono consolidati. Con la sola eccezione delle staminali del sangue (spesso impiegate in trapianti diretti, senza espansione in vitro) e della pelle, uno dei casi rari di isolamento prospettico ed espansione illimitata in vitro senza perdita della multipotenza, in tutti gli altri casi di staminali adulte spesso il prelievo e la crescita in laboratorio ne alterano le caratteristiche.

Prodotti medicinali a base di cellule staminali

Le cellule staminali – diversamente dai più comuni farmaci costituiti da piccole molecole – rappresentano una classe distinta di medicinali in quanto prodotti attraverso un processo biologico. Al contrario dei classici prodotti farmaceutici, i prodotti medicinali cellulari contengono elementi cellulari vivi come principio attivo. Negli ultimi anni la normativa per il loro utilizzo clinico è diventata molto restrittiva per salvaguardare gli aspetti di riproducibilità e sicurezza oltre che di standardizzazione del trattamento (vedi **CD**: Approfondimento 18.2. *Linee guida per la messa a punto di prodotti medicinali a base di cellule*). I prodotti a base di cellule possono essere combinati con biomolecole e componenti non cellulari, inclusi dispositivi medici e matrici, e possono essere modificati geneticamente. La *prima generazione* di prodotti consiste in cellule umane naturali non modificate, tipicamente nel loro stato d'origine, come ad esempio le cellule staminali ematopoietiche non modificate isolate dal midollo osseo e utilizzate in clinica come trattamento standard per le malattie del sangue. La *seconda generazione* di prodotti cellulari è tipicamente costituita da cellule guidate con l'aiuto di fattori di crescita, purificate in base alla presenza di bio-marcatori tissutali specifici o modificati al fine di implementarne le proprietà terapeutiche. Lo scopo dell'utilizzo dei prodotti cellulari di seconda generazione è quello di produrre una progenie con migliorate caratteristiche di efficacia e sicurezza rispetto alla popolazione cellulare staminale di partenza, riducendo il rischio di formazione di tumori o di incompatibilità immunologica. I prodotti di *terza generazione* possiedono la caratteristica aggiuntiva di servire come piattaforme per la produzione e il rilascio di componenti solubili nel tessuto trapiantato. Una piattaforma di questo tipo può garantire un sistema di produzione in vivo di materiale genico per colpire e correggere anomalie geniche o consentire il rilascio endogeno di prodotti terapeutici, quali ad esempio prodotti proteici ricombinanti che aumentano la tolleranza allo stress delle cellule endogene e di quelle trapiantate o che favoriscono il processo rigenerativo del tessuto. In altre parole, lo scopo dei prodotti cellulari è quello di ottimizzare la strategia terapeutica andando oltre il potenziale originale delle cellule staminali o della loro progenie.

Applicazioni della terapia cellulare e della medicina rigenerativa

Come già avviene per molti prodotti biologici, l'immunotolleranza è uno degli aspetti più critici per l'utilizzo sicuro ed efficace di terapie basate sulle cellule staminali. Le terapie cellulari sono classificate in autologhe e allogene. Il termine "autologo" si usa in riferimento al trapianto di tessuto, cellule o proteine da un distretto corporeo a un altro del paziente stesso; il termine "allogene" (o eterologo) indica invece il trapianto tra individui geneticamente distinti appartenenti alla stessa specie.

Le applicazioni di terapia cellulare basate sul trapianto allogeneico di midollo osseo o di cellule ematopoietiche per la cura di diverse malattie del sangue rappresenta ormai da quasi un ventennio una procedura clinica ricca di successi e nota ai più (vedi **CD**: Approfondimento 18.3. *Utilizzo delle cellule staminali ematopoietiche per la cura di malattie del sangue*). In questa sezione verranno trattate alcune sperimentazioni innovative e un caso di successo, la cura delle lesioni alla cornea, basate su cellule staminali adulte (Figura 18.2, per esempi di tipologie di staminali adulte descritte di seguito).

Approcci di medicina rigenerativa per il trattamento delle lesioni degli epitelii di rivestimento

In seguito a lesioni di vario tipo, la cute è in grado di ricostruire in pochi giorni uno strato corneo perfettamente funzionale, garantendo piena protezione da disidratazione e infezioni, a partire da diversi tipi di cellule staminali specializzate site a livello dello strato basale del derma (staminali responsabili della rigenerazione dell'epidermide), del "bulge" (staminali responsabili della crescita pilifera) e dell'istmo (staminali deputate alla generazione delle ghiandole sebacee). Più di recente, nel 2010, il gruppo di Hans Clevers ha scoperto una nuova popolazione staminale della pelle che è in grado di produrre i tre tipi di staminali della pelle più "specializzati" (Figura 18.2). Tuttavia, esistono casi in cui la gravità delle lesioni (ad esempio, ustioni gravi ed estese) impedisce un adeguato riparo quantitativo e qualitativo della cute, arrivando, nei casi più gravi, a compromettere la vita del paziente. In questi casi, già da diversi anni è possibile effettuare trapianti di pelle autologa. Il nuovo tessuto cutaneo viene generato in vitro su matrici di collagene e matrigel, a partire da progenitori e staminali cutanee derivanti da piccole biopsie della cute del paziente. Pioniere di questo filone di ricerca è stato Howard Green. Fu proprio Green, a Boston nel 1983, a eseguire il primo trapianto di pelle coltivata su tre bambini ustionati gravi. Da allora centinaia di pazienti hanno beneficiato di questo trattamento salvavita. Tuttavia, i costi elevati (servono più di 150.000 euro per trattare un individuo adulto con ustioni sull'80% del corpo) e la necessità di diversi mesi per ricostruire lembi di pelle estesi, di fatto ne limitano la piena diffusione in clinica. In aggiunta, sebbene questo oggi rappresenti uno straordinario trattamento salvavita, i malati trapiantati chiedono una vita migliore. La pelle così rigenerata, a partire da cellule staminali interfollicolo-

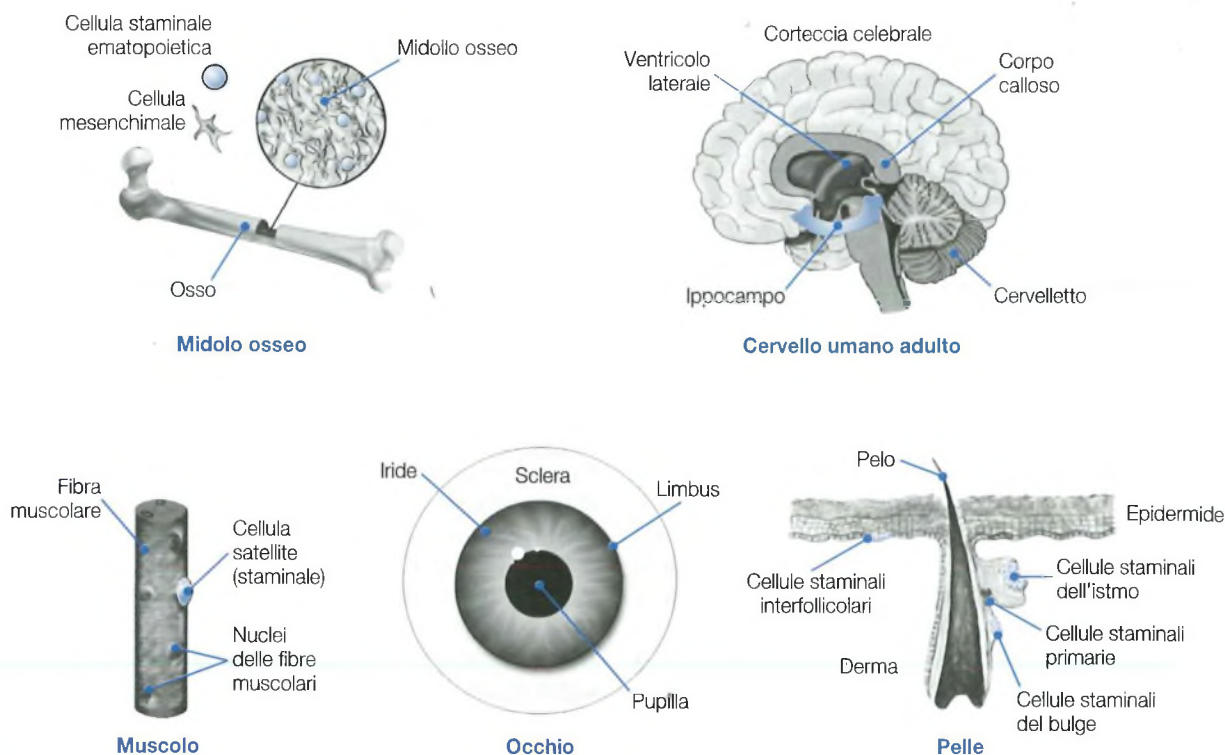


FIGURA 18.2 Esempi di cellule staminali adulte presenti in specifici distretti tissutali. Sono indicate le cellule staminali ematopoietiche presenti nel midollo osseo, le cellule staminali del cervello presenti nella zona sottoventricolare (SVZ) del ventricolo laterale e nell'ippocampo, le cellule satellite del muscolo e le cellule staminali della cornea residenti a livello del limbus. Nella pelle sono invece state identificate inizialmente tre tipi di cellule staminali "specializzate" a livello dello strato basale (cellule staminali interfollicolari che ricostituiscono l'epidermide), a livello del bulge (deputate alla crescita pilifera) e dell'istmo (deputate alla formazione delle ghiandole sebacee). Più recentemente è stata individuata una nuova popolazione di cellule staminali comuni, dalla quale originano tutti gli altri tipi di staminali della pelle.

lari, infatti, non è ottimale in quanto priva di ghiandole sudorifere e di bulbi piliferi, provocando anomalie nella termoregolazione e nella fisiologia di questo importante tessuto. Lo sviluppo di metodologie efficaci per la crescita delle staminali "comuni" della pelle potrebbe in futuro permettere di ottenere in vitro pelle qualitativamente identica a quella dell'individuo (contenente anche strutture quali i bulbi piliferi e le ghiandole sebacee).

Un altro epitelio che è possibile rigenerare completamente in vitro e per il quale esistono da tempo protocolli clinici efficaci è costituito dall'epitelio corneale. Nei casi in cui l'occhio viene lesionato nell'epitelio corneale – quel tessuto che garantisce la capacità visiva filtrando la luce che arriva alla retina – ad esempio, a causa di ustioni chimiche, è possibile effettuare dei trapianti di staminali della cornea. Infatti, in presenza di queste lesioni, l'epitelio congiuntivale, che costituisce la parte visibile bianca dell'occhio, prende il sopravvento portando alla formazione di quello che in termini clinici si chiama "pannus" e che copre tutto il bulbo, causando cecità. In molti casi, è possibile ricostruire la cornea partendo da staminali presenti a livello del limbus dell'occhio (Figura 18.2), una striscia di cellule, di cui circa il 10% con caratteristiche staminali, che circonda la cornea. Le staminali limbari, responsabili della rigenerazione del tessuto corneale che

avviene ogni 9 mesi, una volta messe in coltura sono in grado di ricostruire in circa 3-4 settimane un lembo di epitelio corneale che viene impiantato al posto di quello compromesso. Tra i pionieri di questa tecnologia vi sono Graziella Pellegrini e Michele De Luca che nel 1997 pubblicarono il primo studio sulla coltivazione della cornea a partire da staminali. Più di recente, questi ricercatori, insieme a Paolo Rama, hanno perfezionato la tecnica per curare i casi in cui il normale trapianto di staminali corneali si dimostrava inefficace a causa dell'estensione della lesione (3-4% dei casi di lesioni della cornea). In questo caso, prima del trapianto di cornea, si provvede a una ricostruzione della regione limbare grazie al trapianto di staminali autologhe o da donatore compatibile, nel caso in cui le regioni limbare di entrambi gli occhi non siano utilizzabili. Questo trattamento si è dimostrato molto efficace, con una percentuale di successo completo superiore al 75% dei casi.

Approcci di medicina rigenerativa per il trattamento delle disfunzioni cardiache

Il cuore è uno degli organi che si pensava dispensato da processi rigenerativi. In realtà, studi recenti hanno evidenziato che nel miocardio umano potrebbero risiedere dei progenitori, i quali possono rigenerare, in condizioni

normali, l'intero set di miocardiociti di un cuore adulto in circa 4,5 anni. Tuttavia questi risultati sono molto dibattuti, sia per quel che riguarda l'effettiva capacità rigenerativa (alcuni studi stimano un turn-over dei cardiomiociti molto più ridotto, pari al ricambio dell'1% di cardiomiociti all'anno) sia per la presenza concreta di progenitori nel cuore adulto. Nonostante ciò, l'utilizzo delle cellule staminali per riparare il tessuto cardiaco rappresenta uno degli ambiti applicativi che attrae maggiori interessi anche se non è ancora chiaro come ottenere cellule del miocardio che siano il più possibile simili a quelle della sede cardiaca lesionata. Le cellule muscolari cardiache (cardiomiociti) differiscono infatti tra loro a seconda della zona del cuore da esse popolata. I miocardiociti degli atri sono, ad esempio, diversi da quelli dei ventricoli, così come nella parete ventricolare diversi sono i miocardiociti della superficie da quelli che risiedono negli strati più profondi. A complicare ancora di più il quadro si aggiungono, infine, le cellule cardiache che originano e conducono lo stimolo elettrico, responsabili del ritmo battito cardiaco, anch'esse differenti da quelle deputate esclusivamente alla contrazione muscolare. A oggi, le uniche fonti da cui è stato possibile ottenere un buon numero di cardiomiociti funzionali sono rappresentate dai miocardiociti fetali e dalle cellule pluripotenti (cellule ES e iPS). Per i primi, il loro utilizzo nella pratica clinica è difficilmente immaginabile a causa della natura eterologa e della scarsità di materiale reperibile, mentre, per quanto riguarda l'utilizzo di miocardiociti derivati da cellule ES e iPS, al momento il loro utilizzo è limitato ai soli studi preclinici su animali, dovendo risolvere ancora le problematiche di sicurezza. Nonostante non vi siano forti prove precliniche circa l'impiego di una staminale o di un'altra, l'ambito cardiaco ha visto il maggior numero di trial clinici effettuati con differenti tipologie di staminali e su patologie cardiache; nessuno di essi ha però evidenziato recuperi funzionali consistenti e duraturi e/o la produzione di nuovi miocardiociti a partire dalle cellule trapiantate. I primi studi clinici erano stati effettuati trapiantando mioblasti del muscolo scheletrico in pazienti con infarto del miocardio; tuttavia i risultati sono stati sconcertanti non avendo evidenziato un apprezzabile recupero morfofunzionale, e anzi, avendo evidenziato l'insorgenza di aritmie ventricolari. Gli studi più estesi (circa una ventina di studi che hanno coinvolto più di 2000 pazienti, con un follow-up da 3 mesi a un anno) hanno visto il trapianto, per via intracoronale, di cellule staminali autologhe del midollo osseo o dal sangue periferico in pazienti con infarto acuto del miocardio. Nell'insieme questi studi hanno fallito nell'evidenziare un chiaro recupero clinico; in alcuni casi si è evidenziato un limitato aumento transiente, di circa il 3%, della frazione di eiezione del ventricolo sinistro ma senza grossi miglioramenti a carico dell'estensione della zona infartuata. Questi studi hanno comunque dimostrato che questo genere di approccio non risulta pericoloso per il paziente. Inoltre, sembrerebbe che questa tipologia di trapianto possa facilitare il rimodellamento del tessuto infartuato, probabilmente attraverso il rilascio di sostanze protettive, e un aumento, seppur limitato, dei processi di

rivascolarizzazione. Questi aspetti, potrebbero essere alla base dei risultati decisamente più incoraggianti che derivano dagli studi clinici per la cura dell'angina refrattaria che vede nella rivascolarizzazione un aspetto critico. Si tratta in questo caso di studi clinici di fase II su un esteso numero di pazienti per approfondire i risultati positivi ottenuti in fase I.

Approcci di medicina rigenerativa per il trattamento del muscolo scheletrico

Il muscolo scheletrico è il tessuto preponderante del corpo umano e contiene una popolazione di progenitori muscolari, le cosiddette "cellule satellite" (Figura 18.2) che sono in grado di provvedere al riparo fisiologico di questo tessuto mediante l'aggiunta di nuove fibre muscolari. In alcune patologie, quali la distrofia muscolare di Duchenne, il muscolo scheletrico va incontro a progressiva degenerazione perdendo ogni capacità rigenerativa intrinseca. Per il trattamento di queste patologie degenerative sono stati vagliati, in ambito preclinico, approcci basati sul trapianto di diverse tipologie di cellule staminali con attività miogenica. Tra queste vanno annoverate le cellule satellite, ma anche le cellule CD133+ estratte dal muscolo scheletrico o dal midollo osseo, oltre ai progenitori endoteliali e ai "mesangioblasti". Tutte queste popolazioni mostrano capacità miogenica in vitro; tuttavia una vera e consistente capacità miogenica in vivo in seguito a trapianto è stata evidenziata solo per le cellule satellite e i mesangioblasti. Le potenzialità delle cellule satellite sembrano tuttavia limitate da ridotta sopravvivenza, migrazione e colonizzazione del tessuto muscolare bersaglio dopo trapianto. Diversamente, i mesangioblasti, isolati dal topo nel 2003 e poi nell'uomo dal gruppo di Giulio Cossu, sono cellule capaci di differenziare in diversi tipi cellulari del mesoderma, incluso il muscolo scheletrico. Il loro trapianto, per via endovenosa, in topi distrofici produce un recupero funzionale dei muscoli iniettati e un miglioramento clinico in modelli di cani distrofici. È al momento in fase di avvio un trial clinico su un ristretto numero di pazienti distrofici.

Approcci di medicina rigenerativa per il trattamento del sistema nervoso centrale

Quando si parla di malattie degenerative del SNC, si fa riferimento a un'eterogenea famiglia di malattie per lo più prive di trattamento farmacologico, che include malattie con caratteristiche eziopatologiche e sintomatologiche ben distinte tra loro. Proprio in virtù di questa eterogeneità, quando si pensa a una terapia cellulare rivolta a queste malattie, si devono distinguere diversi "livelli" di requisiti necessari per lo sviluppo di un approccio trapiantologico adeguato. Infatti, vi sono *patologie a degenerazione non neuronale* (quale ad esempio la sclerosi multipla) in cui il danno preponderante è causato da una perdita di oligodendrociti e quindi da una demielinizzazione degli assoni, e *patologie prettamente neuronali* in cui si verifica una perdita accentuata di sottopopolazioni neuronali. In questo secondo caso si possono distinguere tre principali classi di malattie causate da: a) *degenerazione neuronale dei sistemi*

paracrini (quale ad esempio il morbo di Parkinson) in cui si mira a ripristinare l'identità neurochimica funzionale mancante – ad esempio la produzione di dopamina – più che a ricostruire circuitazioni cerebrali; b) *degenerazione neuronale selettiva* (quali ad esempio la corea di Huntington e la sclerosi laterale amiotrofica) per il cui trattamento prevede il ripristino della popolazione neuronale selettivamente colpita dalla malattia, ma assicurando anche il ripristino della circuitazione con le altre cellule neuronali del malato; c) *degenerazione neuronale globale* (quale ad esempio le lesioni midollari o l'ictus cerebrale), in cui si verifica una degenerazione più o meno estesa di diverse popolazioni neuronali; in quest'ultimo caso per riparare il danno, con il trapianto si dovranno produrre diverse popolazioni neuronali specifiche e ricostruire circuitazioni molto complesse a breve e lunga distanza, sia all'interno del trapianto stesso che con gli elementi neuronali del tessuto circostante. Detto questo, è importante sottolineare come negli ultimi vent'anni, l'approccio trapiantologico in clinica, mediante l'utilizzo di tessuto nervoso fetale umano, è stato sperimentato per il morbo di Parkinson e per la corea di Huntington ottenendo risultati eterogenei in termini di sopravvivenza del materiale e di recupero funzionale per il paziente. Negli ultimi anni, grazie alla possibilità di isolare ed espandere in vitro cellule staminali neurali umane ottenute da cervello fetale o adulto (esistono cellule staminali adulte del cervello site nella zona sottoventricolare del quarto ventricolo e a livello dell'ippocampo; Figura 18.2) o da cellule pluripotenti (ES e iPS), le speranze di raggiungere risultati più soddisfacenti si sono moltiplicate. Nonostante tutte queste aspettative, la realtà è ben lontana dal garantire un utilizzo clinico efficace e sicuro di queste cellule. A oggi, sono pochi, e confinati a limitati studi preclinici, i risultati nell'animale che ipotizzano una utilità terapeutica delle cellule staminali neurali. Gli studi clinici che prevedono l'utilizzo di cellule staminali per il trattamento di malattie del cervello attualmente in fase di realizzazione nel mondo sono limitati a meno di una decina di studi in fase I e tutti approvati a tre principali aziende biotecnologiche (www.clinicaltrials.gov). Si tratta della ReNeuron (http://www.reneuron.com/company_info/ren001_for_stroke/), che sta vagliando l'uso di cellule staminali neurali immortalizzate (ottenute da feti umani alla 12^a settimana) in pazienti colpiti da ischemia cerebrale. I primi dati a proposito sembrano indicare una scarsa sopravvivenza delle cellule trapiantate e non mostrare beneficio per i pazienti. La StemCells (<http://www.stemcellsinc.com/Therapeutic-Programs/Clinical-Trials.htm>) e la Neuralstem (<http://www.neuralstem.com/index.asp?pgid=1>) stanno invece effettuando studi che prevedono l'impianto di cellule staminali neurali umane non immortalizzate per il trattamento della sindrome di Batten, della sclerosi laterale amiotrofica e delle lesioni midollari croniche. Infine, la Geron (<http://www.geron.com/GRNOPC1Trial/>) sta effettuando un trial clinico in fase I utilizzando precursori oligodendrogliali derivati da cellule ES umane per il trattamento di lesioni midollari acute. Anche la Advanced Cell Technology ha avuto l'autorizzazione a procedere con cellule ES umane per la degenerazione

maculare. Nell'insieme, questi studi forniranno dei dati iniziali sull'utilizzo clinico delle cellule staminali per il trattamento di patologie degenerative cerebrali, soprattutto per quel che concerne gli aspetti di sicurezza. Quest'ultimo rappresenta un aspetto fondamentale, soprattutto in relazione alle sempre più numerose aziende nel mondo che, in assenza di evidenze sperimentali, offrono trattamenti basati su staminali per curare diverse patologie, tra le quali anche quelle relative al cervello. Emblematico è il caso, riportato recentemente, di un bambino israeliano di 9 anni con una malattia rara del cervello (atassia telangectasica) trattato con (presunte) cellule staminali fetali in una clinica russa. Quattro anni dopo i ripetuti trapianti, in seguito all'insorgenza di una sintomatologia neurologica grave, una TAC evidenziava lo sviluppo di un tumore al cervello e al midollo spinale provocato dall'eccessiva proliferazione delle cellule trapiantate.

Terapia genica

Il principio della terapia genica somatica è quello di compensare il malfunzionamento di un gene di un paziente. Essa si prefigge di curare diverse patologie ereditarie o acquisite attraverso l'introduzione di acidi nucleici (comunemente geni o frammenti di geni) nelle cellule dei pazienti. Nella sua formulazione iniziale, la terapia genica si proponeva di trasferire una copia normale di un gene mutato nell'appropriato tessuto, al fine di curare patologie con ereditarietà monogenica e fenotipo recessivo (quali la fibrosi cistica, le emofilie, le distrofie muscolari). In questo senso, il farmaco è quindi rappresentato dalla proteina terapeutica codificata dal gene o dal corrispondente cDNA trasferito, o dall'acido nucleico stesso. Tuttavia, il repertorio dei geni terapeutici si estende ben al di là di quelli con funzione sostitutiva, e comprende anche geni o frammenti di DNA o RNA con funzioni di regolazione sull'attività della cellula o di modulazione del sistema immunitario. Di conseguenza, lo spettro di potenzialità terapeutiche della terapia genica si estende oggi anche a molte malattie acquisite con grande diffusione, quali i tumori e le malattie cardiovascolari.

Il primo protocollo di terapia genica approvato negli Stati Uniti per una deficienza ereditaria del sistema immunitario risale al 1990. Oggi, quasi un migliaio di protocolli sono in corso in tutto il mondo, i due terzi circa dei quali sono per il trattamento di varie forme e stadi di cancro. È in corso anche un'ampia varietà di altri trial clinici, la maggior parte dei quali riguardano malattie cardiovascolari, malattie infettive (quasi tutte correlate all'HIV) e i disordini ereditari autosomici recessivi provocati da difetti di un singolo gene, come la fibrosi cistica.

Nel complesso, le conclusioni che è possibile trarre dai risultati degli studi condotti a oggi, sono che la terapia genica sta diventando una pratica sempre più sicura per i pazienti ma anche che la sua utilità è ancora limitata, principalmente a causa di una serie di problematiche, soprattutto tecniche, che verranno delineate nei paragrafi seguenti.

Tipologie di protocolli di terapia genica

Generalmente si considerano due tipi di approccio terapeutico nel contesto della terapia genica, ovvero il trasferimento di acidi nucleici *ex vivo* e *in vivo* (Figura 18.3).

Terapia genica *ex vivo*

Nella terapia genica *ex vivo*, le cellule del paziente sono isolate e coltivate in vitro. Durante questo periodo il gene terapeutico è trasferito nelle cellule che sono infine reinserite nello stesso paziente da cui erano state prelevate. In questo caso, le cellule bersaglio devono quindi essere accessibili, isolabili dal paziente, manipolabili e reiniettabili (ad esempio, introdotte mediante aerosol o iniezione nel torrente circolatorio) nel paziente stesso. Il vantaggio di questo approccio è rappresentato dalla ridotta probabilità di indurre una risposta immune contro il vettore necessario per veicolare il gene, ma la procedura è ovviamente più laboriosa e costosa, anche perché va personalizzata per ogni singolo paziente per evitare problematiche relative al rigetto. Lo spettro dei possibili tipi cellulari che possono essere mantenuti ed espansi *ex vivo* si è allargato negli ultimi anni, e comprende, oltre ai linfociti e alle cellule staminali ematopoietiche, anche una serie di cellule con fenotipo staminale e con capacità di dare origine a tipi cellulari diversi, tra cui le cellule dell'epidermide, i precursori delle cellule endoteliali dei vasi, i progenitori delle cellule muscolari. La possibilità di trasferimento genico in cellule staminali offre importanti possibilità terapeutiche

in cui la terapia genica si affianca alla terapia cellulare e rigenerativa rendendo il trattamento definitivo, e può in principio comprendere il trattamento di alcune malattie ereditarie (ad esempio, le distrofie muscolari) o degenerative (ad esempio, il morbo di Parkinson o l'infarto del miocardio).

Terapia genica *in vivo*

Nella terapia genica *in vivo*, il gene terapeutico è inserito direttamente nelle cellule del paziente all'interno dell'organismo. In linea di principio, questo approccio è più semplice e, una volta ottimizzato, può essere applicato a un numero illimitato di pazienti che presentino la stessa patologia. Vanno tuttavia tenute presenti le seguenti considerazioni.

- ▶ Molti tessuti sono difficili da raggiungere o da trasdurre in maniera quantitativamente significativa *in vivo*. Ad esempio, è arduo considerare una terapia genica estesa nel tessuto nervoso o nella cartilagine; in questi casi, la terapia genica è inevitabilmente circoscritta alla somministrazione del gene terapeutico in ristretti distretti tissutali.
- ▶ È problematico scongiurare il pericolo di trasferire il gene terapeutico in tipi cellulari diversi dalla cellula bersaglio, dove la sua espressione potrebbe rivelarsi dannosa.
- ▶ Il vettore per il trasferimento del gene terapeutico, quando somministrato direttamente *in vivo*, è più

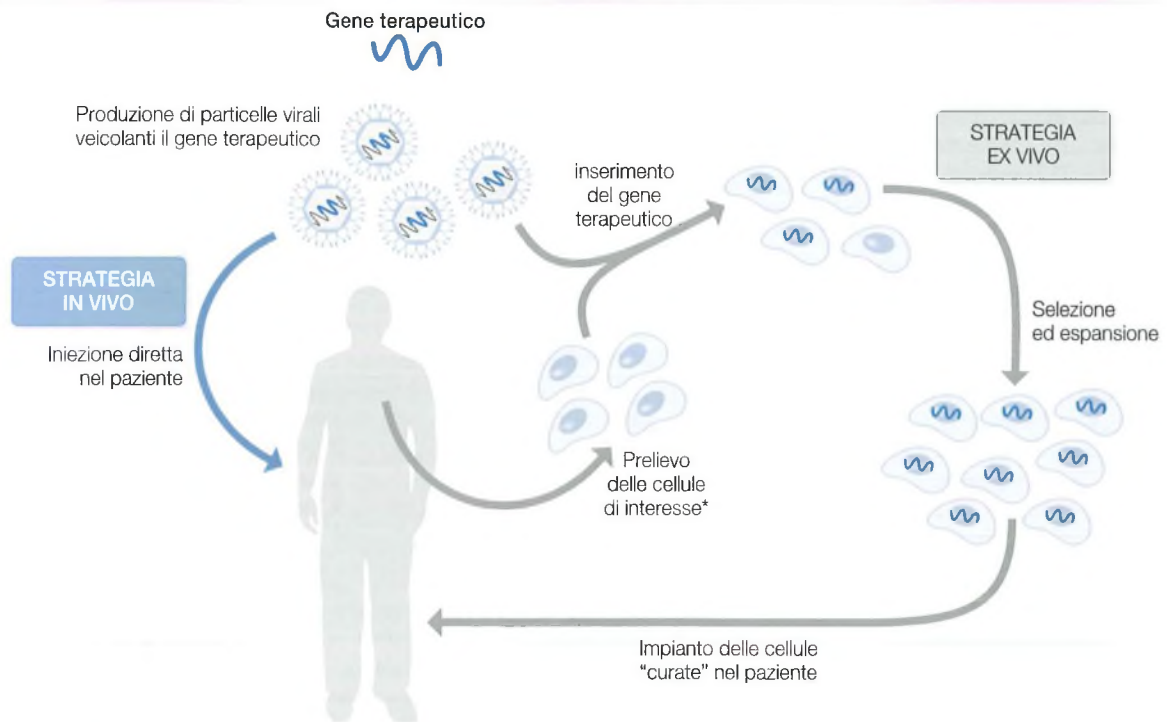


FIGURA 18.3 Le due principali strategie di intervento mediante terapia genica. Nelle strategie *in vivo*, il gene terapeutico è trasferito direttamente nelle cellule bersaglio all'interno del corpo del paziente; nelle strategie *ex vivo*, le cellule bersaglio vengono manipolate *in vitro* e poi impiantate nel paziente.

* Possono essere utilizzate cellule autologhe o eterologhe; in linea teorica si possono derivare anche le cellule di interesse partendo da cellule staminali pluripotenti (cellule ES o cellule iPS; queste ultime possono essere autologhe)

soggetto alla possibilità di inattivazione (da parte del complemento, come nel caso dei vettori retrovirali, o di anticorpi specifici neutralizzanti) e comunque suscita risposte immunitarie del paziente.

- La maggior parte delle cellule dell'organismo (tra cui le cellule del muscolo, del cervello, dell'endotelio vascolare, del fegato) sono in uno stato di quiescenza replicativa. Questo limita l'applicazione di vettori, quali i vettori retrovirali, che necessitano che la cellula bersaglio dell'infezione sia in attiva replicazione.

Nella tabella 18.2 sono riportate le principali caratteristiche positive e negative relative a ognuno dei principali metodi di veicolazione genica utilizzati in terapia genica. In questo capitolo ci focalizzeremo sulle applicazioni basate su vettori virali sicuri (vedi CD: Approfondimento 18.4. *Preparazione di vettori virali sicuri per la terapia genica delle cellule somatiche*) che rappresentano a oggi la scelta più perseguita (complessivamente quasi l'80% degli attuali trial di terapia genica si basano sull'utilizzo di vettori virali).

Applicazioni della terapia genica

Risale al 1999 una delle pagine più tragiche della terapia genica. Jesse Gelsinger, un ragazzo di 18 anni affetto da una forma lieve di deficienza parziale di ornitina transcarbamilasi (OTC), il primo paziente a essere sottoposto a un trattamento di terapia genica, morì pochi giorni dopo il

trattamento a causa di una risposta iperimmune contro la grande quantità di vettore iniettata. A Gelsinger fu somministrata nella vena porta un'alta dose di vettore adenovirale ricombinante che portava il gene normale OTC. Il paziente ricevette quasi 40 miliardi di particelle virali, la dose più alta mai somministrata in un trial clinico. Dopo questo triste esordio, centinaia di protocolli di terapia genica sono stati messi a punto. Va considerato il fatto che circa tre quarti delle sperimentazioni condotte a oggi è di fase I. Mancano quindi a tutt'oggi dati esaurienti e attendibili sulla loro effettiva efficacia e riproducibilità terapeutica. Di seguito sono indicati alcuni esempi di protocolli clinici di terapia genica in corso e delle problematiche con cui questa disciplina si confronta.

Terapia genica delle malattie ereditarie monogeniche

Sindromi da immunodeficienza ereditaria

Rappresenta senz'altro il *gold standard* della sperimentazione di terapia genica. Messo a punto dai tre ricercatori statunitensi French Anderson, Michael Blaese e Kenneth Culver, il primo trial clinico per il trattamento di una patologia ereditaria ebbe inizio nel 1990. Il protocollo di terapia genica *ex vivo* fu disegnato in modo da trattare una bambina di quattro anni con immunodeficienza combinata grave (SCID), dovuta alla mancata produzione di adenosina deaminasi (ADA). L'ADA è un enzima essenziale coinvolto nel metabolismo purinico. La mancanza

TABELLA 18.2 Metodi di veicolazione genica utilizzabili per la terapia genica

Metodo	Vettore	Vantaggi	Svantaggi
Iniezione diretta	DNA nudo	<ul style="list-style-type: none"> Non patogeno Semplicità d'uso Nessun limite alle dimensioni del transgene 	<ul style="list-style-type: none"> Bassa efficienza Espressione transiente del transgene
Chimico	Liposomi	<ul style="list-style-type: none"> Non patogeno Semplicità d'uso Nessun limite alle dimensioni del transgene 	<ul style="list-style-type: none"> Bassa efficienza Espressione transiente del transgene
Fisico	Elettroporazione	<ul style="list-style-type: none"> Non patogeno Semplicità d'uso Nessun limite alle dimensioni del transgene 	<ul style="list-style-type: none"> Bassa efficienza Espressione transiente del transgene
Trasduzione virale	Retrovirus	<ul style="list-style-type: none"> Efficienza di trasduzione Integrazione stabile nel genoma ospite Scarsa immunogenicità 	<ul style="list-style-type: none"> Difficile da produrre ad alto titolo Possibile mutagenesi inserzionale Trasduce solo cellule in divisione
	Lentivirus	<ul style="list-style-type: none"> Efficienza di trasduzione Trasduce cellule sia proliferanti che quiescenti Integrazione stabile nel genoma ospite Scarsa immunogenicità 	<ul style="list-style-type: none"> Difficile da produrre ad alto titolo Possibile mutagenesi inserzionale Trasduce solo cellule in divisione
	Adenovirus	<ul style="list-style-type: none"> Efficienza di trasduzione Trasduce cellule sia proliferanti che quiescenti Mantenimento in forma episomiale Alta capacità di clonazione Elevati livelli di espressione del transgene 	<ul style="list-style-type: none"> Espressione transiente del transgene Alta immunogenicità
	Virus adenoassociato	<ul style="list-style-type: none"> Non patogeno per l'uomo Scarsa immunogenicità Trasduce cellule sia proliferanti che quiescenti 	<ul style="list-style-type: none"> Scarsa capacità di clonazione (<5 kb) Espressione del transgene variabile Possibile mutagenesi inserzionale
	Herpesvirus	<ul style="list-style-type: none"> Alta capacità di clonazione Trasduce cellule sia proliferanti che quiescenti Alto tropismo per le cellule nervose Mantenimento in forma episomiale 	<ul style="list-style-type: none"> Difficoltà di manipolazione Possibile immunogenicità

di ADA causa un danno selettivo a carico dei linfociti T con conseguente grave immunodeficienza. I sintomi tipici dell'ADA-SCID comprendono gravi infezioni ricorrenti, soprattutto delle vie respiratorie e del tratto gastroenterostinale, dissenteria cronica e ridotta velocità di crescita. L'inizio della sintomatologia si manifesta nel periodo neonatale, ma può essere ritardato di parecchi mesi, durante i quali gli anticorpi materni passati attraverso la placenta forniscono un'adeguata protezione. Senza una rapida diagnosi e l'inizio di un valido trattamento, la maggioranza dei bambini non arriva ai due anni di età. Il trattamento classico dell'ADA-SCID comprende il trapianto di midollo e iniezioni settimanali di ADA. La terapia genica è stata esplorata come alternativa perché i trapianti spesso manifestano esito fallimentare e la terapia enzimatica risulta improduttiva in molti pazienti. Il primo trial clinico fu seguito l'anno successivo da un secondo trial. Poiché non si osservarono effetti collaterali, altri 11 bambini furono inseriti nel trial di terapia genica nel 1996. Si usava un approccio *ex vivo* in cui il cDNA di ADA umano veniva introdotto nei linfociti T tramite trasferimento genico mediato da retrovirus. I linfociti T con il gene corretto venivano quindi infusi nei pazienti con conseguente miglioramento del quadro clinico, legato alla persistenza in circolo delle cellule geneticamente modificate. Studi successivi di ricercatori italiani si sono basati sulla manipolazione *ex vivo* di cellule staminali ematopoietiche, nel tentativo di rendere il trattamento definitivo. Bisogna sottolineare il fatto che accanto al trattamento di terapia genica, i bambini vennero mantenuti sotto regime di trattamento farmacologico consistente nella somministrazione settimanale di ADA. La continua somministrazione di ADA durante la terapia genica era necessaria per evitare il dilemma etico di sospendere e bloccare del tutto una terapia che salvava la vita, per controllare un trattamento in sperimentazione. Vettori retrovirali che esprimono ADA umano sono stati usati per trasdurre linfociti periferici e cellule del midollo di questi pazienti.

La terapia genica è stata usata anche per trattare una forma legata al cromosoma X di immunodeficienza combinata grave (X-SCID), una condizione letale dovuta a mutazioni del gene che codifica per la catena comune γ , che partecipa alla formazione di diversi recettori delle cellule del sistema immunitario. Il disordine porta a una deficienza di linfociti T e di cellule natural killer, dovuta a un blocco del differenziamento. I precursori dei linfociti dei pazienti con X-SCID sono continuamente prodotti ma, mancando la catena γ , vanno rapidamente incontro ad apoptosi. Nel 2000, due bambini affetti da X-SCID, all'epoca di 8 e 11 mesi, furono sottoposti in Francia a un trattamento di terapia genica. Entrambi erano molto sofferenti, erano affetti da polmonite, dissenteria e lesioni cutanee. Dai campioni di midollo osseo dei pazienti furono prelevate le cellule staminali ematopoietiche e manipolate *ex vivo* con un vettore retrovirale che veicolava il cDNA del gene sano. Le cellule con il gene corretto vennero quindi reinoculate di nuovo nei pazienti. Non venne fornito, né si rivelò necessario, alcun altro trattamento. Siccome i risultati sembrarono inizialmente molto confortanti, si decise anche di estendere

il trial clinico includendo altri pazienti. Pur partendo da un basso livello di trasferimento genico, la presenza del gene corretto conferiva un enorme vantaggio selettivo ai linfociti che lo esprimevano, e questi proliferavano fino a ricostituire tutto il sistema immunitario nello spazio di pochi mesi, curando quindi completamente il difetto. Questo risultato fu inizialmente considerato il più grande successo della terapia genica. Tuttavia, in seguito, due pazienti svilupparono una leucemia fulminante che portò alla morte di uno di essi. Si stabilì che la causa dell'insorgenza della leucemia era riconducibile, in entrambi i casi, al fatto che il vettore retrovirale si era inserito in prossimità del locus genico del proto-oncogene *LMO2*. Quest'ultimo codifica, infatti, per un fattore di trascrizione fondamentale per l'emopoiesi e, quando sovraespresso, può causare l'insorgenza di leucemie. A causa di questa inattesa e pericolosa complicità, nel 2003 negli Stati Uniti furono sospesi 27 trial clinici. L'anno seguente, fu deciso che la terapia genica per X-SCID poteva essere ripresa, ma restringendone l'utilizzo ai soli pazienti in cui la terapia trapiantologica non si era dimostrata efficace. Tuttavia, nel 2005, si verificò un terzo caso di leucemia, il che portò nuovamente alla sospensione dei trial clinici in Francia e negli Stati Uniti.

Malattie genetiche dell'epidermide

Numerose mutazioni a carico dei geni delle cheratine o di altre proteine strutturali possono causare rare ma importanti patologie della pelle che, nei casi più gravi, portano al distacco dell'epidermide. Da alcuni anni è possibile isolare e coltivare in vitro cellule staminali della pelle capaci di rigenerare la pelle del corpo. Molto interessante è quindi riposto nelle attuali sperimentazioni che contemplano l'autotrapianto di cheratinociti derivati da cellule staminali geneticamente trasdotte. Uno di questi studi è stato condotto nel 2006 da Michele De Luca per trattare un paziente affetto da epidermolisi bullosa giunzionale. Questa è una grave malattia della pelle del viso, del torace e delle gambe, che consiste nella formazione di vesciche causata da un sollevamento dell'epidermide dal tessuto sottostante dovuto alla mutazione dei geni della laminina 5 o 6 che codificano per proteine preposte alla corretta adesione fra gli strati epidermici. Può avere serie complicanze, come infezioni o consistenti perdite di sangue, che possono portare anche alla disidratazione dell'organismo. Le epidermolisi bullose costituiscono un gruppo eterogeneo di patologie che colpiscono circa 30.000 persone in Europa e circa 500.000 nel mondo. In 8 casi su 10 provocano anche carcinomi cutanei. Ad alcuni anni dalla terapia, eseguita su un individuo di 36 anni, la zona della pelle curata con la terapia genica si è completamente rigenerata grazie alle cellule staminali modificate con il gene sano, e non ha sviluppato lesioni. Ora il paziente è in attesa di nuovi trapianti di pelle per sostituire altre porzioni di cute. Questo studio rappresenta il primo successo di un protocollo di terapia genica al di fuori del sistema ematopoietico.

Per altri esempi di terapia genica, vedi **CD**: Approfondimento 18.5. *Terapia genica della fibrosi cistica e dei tumori.*

Prospettive future

Le terapie cellulari e la medicina rigenerativa, sempre più basate sui progressi della biologia delle cellule staminali, hanno iniziato a porre le basi della pratica clinica del futuro. Le sfide ancora aperte al fine di sfruttare appieno le potenzialità delle cellule staminali sono tuttavia ancora molteplici e per raggiungere il goal finale è necessario un approccio multidisciplinare integrato.

Tuttavia, accanto alle prospettive della medicina rigenerativa si è sviluppata una meno controllata "corsa al trapianto" che ha portato numerosi enti e industrie nel mondo a offrire trapianti di staminali adulte per le più diverse situazioni e, nella quasi totalità dei casi, senza alcuna evidenza sperimentale. Si parla in questo caso di "turismo delle staminali", un business veicolato attraverso siti web e strategie pubblicitarie ingannevoli e dannose. Sebbene il tentativo di perseguire qualsiasi strada da parte dei malati e dei loro familiari sia certamente com-

prendibile, dall'altro è fondamentale che medici di base e specialisti, associazioni dei malati e ricercatori si mettano a disposizione per rendere la scelta del paziente la più informata possibile. È a tale scopo che lo scorso anno l'*International Society for Stem Cell Research Society* (ISSCR) ha redatto le linee guida per i pazienti (http://www.isscr.org/clinical_trans/patient_handbook.html) oltre ad avere creato un sito web (<http://www.closerlookatstemcells.org//AM/Template.cfm?Section=Home>) al quale il malato può accedere per chiedere informazioni relativamente alla pubblicità di un trattamento per una malattia fornito in un Paese da un ente.

È inoltre necessario che gli aspetti etici, legali e commerciali riguardanti la ricerca sulle cellule staminali e le relative sperimentazioni cliniche continuino a essere discussi su obiettivi concreti e attraverso strategie che si presentino sempre come medicalmente obiettive, scientificamente oneste e socialmente utili.

- ▶ La medicina rigenerativa e la terapia genica hanno aperto enormi prospettive e aspettative per la realizzazione di terapie innovative per la cura di malattie a oggi non trattabili mediante approcci farmacologici classici.
- ▶ Dal punto di vista applicativo biomedico, deve essere perseguita una sempre più approfondita conoscenza di base delle proprietà biologiche e molecolari delle cellule staminali, con il fine ultimo di aumentarne l'impiego e l'efficacia terapeutica e, nel contempo, ridurre al minimo i rischi clinici.
- ▶ I parametri fondamentali su cui investire per avere un'efficace traslazione clinica delle cellule staminali sono strettamente collegati al raggiungimento di un controllo molto accurato delle loro capacità di crescita, integrazione e maturazione funzionale.

Bibliografia essenziale

- ▶ Blaese RM, Culver KW, Miller AD et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995;270:475-80.
- ▶ Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
- ▶ Hughes V. Therapy on trial. *Nat Med* 2007;13:1008-9.
- ▶ Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S et al. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med* 2006;12:1397-1402.
- ▶ Menasche P. Cardiac cell therapy: Lessons from clinical trials. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50:258-65.
- ▶ Pellegrini G, Traverso CE, Franzini AT et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349:990-3.
- ▶ Rama P, Matuska S, Paganoni G et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 2010;363:147-55.
- ▶ Rossi F, Cattaneo E. Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:401-9.
- ▶ Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A et al. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 2003;301:487-92.
- ▶ Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotechnol* 2011; 29:121-8.
- ▶ Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
- ▶ Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-7.

SEZIONE

5

Modulazione dell'espressione genica

CAPITOLO 19

Farmacologia della trascrizione genica e farmacoepigenomica
Diego Fornasari, Roberta Benfante

CAPITOLO 20

I recettori intracellulari
Adriana Maggi, Elisabetta Vegeto

CAPITOLO 21

Farmacologia degli RNA
Valerio Fulci, Giuseppe Macino

5

Farmacologia della trascrizione genica e farmacoepigenomica

CAPITOLO

19

Diego Fornasari, Roberta Benfante

Obiettivi formativi

- Comprendere le basi molecolari dei meccanismi di regolazione della trascrizione di un gene
- Acquisire nozioni di come si possa modulare farmacologicamente l'espressione genica
- Comprendere come sia possibile sviluppare strategie terapeutiche che abbiano come bersaglio farmacologico i fattori di trascrizione, con l'obiettivo di ripristinare una corretta espressione dei geni la cui alterata espressione è alla base dell'insorgenza di patologie

Introduzione ai meccanismi di regolazione della trascrizione

La trascrizione e la traduzione rappresentano i due eventi biochimici attraverso i quali le informazioni contenute nel genoma, sotto forma di DNA, vengono convertite in proteine. Negli organismi multicellulari, tutte le cellule somatiche dell'individuo contengono il medesimo patrimonio genetico, ma mentre una parte delle proteine è espressa ubiquitariamente (come alcuni enzimi delle principali vie metaboliche), altre sono espresse esclusivamente in un determinato tessuto, come le globine nelle cellule eritroidi o l'albumina nel fegato. In altri casi l'espressione di una proteina è dipendente dalla presenza di opportuni stimoli extracellulari, come nel caso dell'interleuchina 2 nei linfociti T, o varia sulla base dalle richieste funzionali della cellula.

La grande maggioranza dei meccanismi molecolari che governano i livelli di espressione di una determinata proteina, nelle diverse situazioni sopra descritte, opera regolando la trascrizione del relativo gene da parte dell'RNA polimerasi II (RNAP II), l'enzima che catalizza la sintesi DNA-dipendente degli RNA messengeri.

I fattori generali della trascrizione garantiscono il riconoscimento e il corretto posizionamento della RNAP II sulla regione regolatoria del gene

La RNAP II è un complesso multiproteico che possiede la necessaria attività enzimatica per polimerizzare ribonucleotidi, utilizzando come stampo un filamento di

DNA (Figura 19.1). L'inizio della trascrizione richiede quindi il reclutamento e il corretto posizionamento della RNAP II sul gene da trascrivere, in corrispondenza di sequenze specifiche che determinano la regione regolatoria del gene (promotore). A questo scopo la RNAP II è assistita da fattori proteici, definiti fattori generali di trascrizione (GTF, *General Transcription Factors*) della polimerasi II, e identificati mediante lettere alfabetiche (ad esempio, TFIID o TFIIB dove TF sta per *Transcription Factor*). Più precisamente, il complesso di pre-inizio (PIC) è composto dal DNA da trascrivere, dalla RNAP II e da cinque GTF (TFIID, TFIIB, TFIIF, TFIIE, TFIIH) ciascuno con proprietà funzionali e ruoli distinti. Tra questi, TFIID riveste un ruolo fondamentale poiché è esso a iniziare l'ordinata sequenza di eventi che culminerà nella formazione del complesso di pre-inizio (vedi oltre). TFIID è un complesso multiproteico in cui si riconoscono due distinte componenti: la *TATA-box Binding Protein* (TBP), così definita per la sua capacità di riconoscere una sequenza specifica di DNA ricca in adenine e timine, da cui il termine TATA-box, localizzata circa 30 nucleotidi a monte dell'inizio di trascrizione della maggior parte dei geni eucarioti, e i fattori associati a TBP (TAFs: *TATA-box binding protein Associated Factors*). Questi costituiscono un'omogenea famiglia di proteine con consistenti similarità di sequenza e struttura tridimensionale con gli istoni. L'interazione TBP-TATA box costituisce il primo evento nella trascrizione di un gene. Successivamente, TFIIB, dopo aver stabilito interazioni dirette con TBP e con sequenze di DNA immediatamente a monte e a valle della TATA-box, può reclutare la RNAP II sul promotore. Tale reclutamento avviene

principalmente attraverso l'interazione con TFIIF, il quale è, a sua volta, associato alla RNAP II. Le fasi finali di formazione del complesso di pre-inizio prevedono l'ingresso di TFIIE e TFIIH; quest'ultimo fattore è in realtà composto da nove subunità ed è l'unico GTF con attività enzimatiche definite. Più precisamente sono state identificate due attività elicasiche con opposta polarità, fondamentale per consentire lo srotolamento e la denaturazione locale del DNA e un'attività chinasi ciclina-dipendente, responsabile della fosforilazione dei residui di serina nella porzione carbossiterminale di una delle subunità della RNAP II, indispensabile per la transizione tra inizio della trascrizione ed elongazione (Figura 19.1).

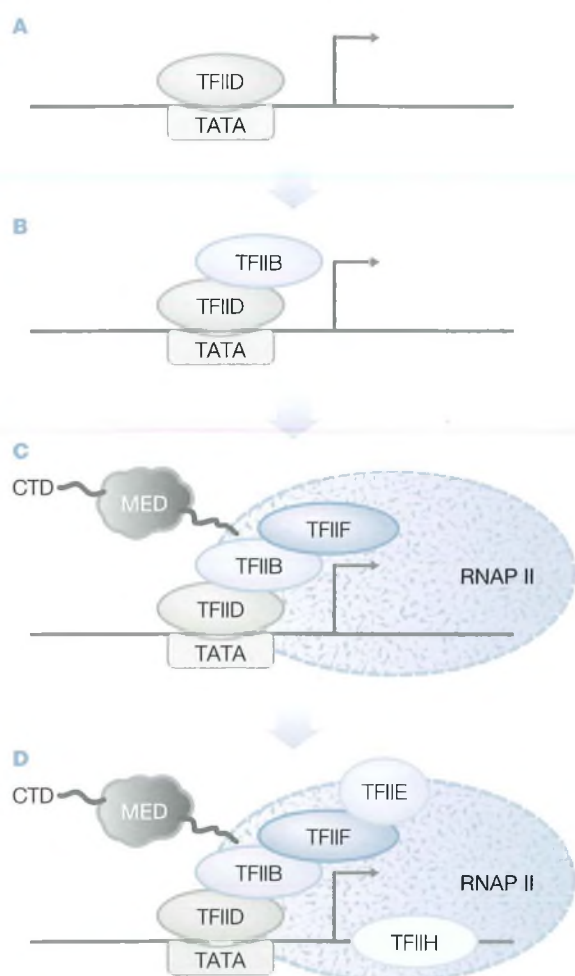


FIGURA 19.1 Formazione del complesso di pre-inizio. RNAPII: RNA polimerasi II; TFI: *Transcription Factor II*; CTD: *Carbossi-Terminal Domain*. **A.** Il primo evento nella formazione del complesso d'inizio è il riconoscimento della TATA-box, da parte del fattore generale di trascrizione TFIID, costituito da *TATA-box Binding Protein* (TBP) e da 12 TAFs (*TBP-Associated Factors*). **B.** L'interazione di TFIID con TFIIB determina il reclutamento e il posizionamento dell'RNAP II sul DNA. **C.** La coda carbossiterminale (CTD) dell'RNAPII lega il complesso co-attivatore Mediator (MED). **D.** L'ingresso di TFIIE e TFIIH completa la formazione del complesso di pre-inizio.

Il promotore è una struttura multifunzionale composta da elementi di regolazione positivi e negativi

È noto da molto tempo come i promotori dei geni eucarioti contengano sequenze specifiche di DNA, generalmente, ma non necessariamente, localizzate a monte della TATA-box le quali sono in grado di stimolare la trascrizione in virtù della loro capacità di legare altri fattori di trascrizione, diversi dai GTF, genericamente definiti attivatori. Gli attivatori e i repressori sono fattori di trascrizione con la duplice proprietà di legare direttamente il DNA in maniera sequenza-specifica e di interagire attraverso i co-fattori generali (TAF e Mediator) e co-fattori specifici (vedi oltre) con il complesso di pre-inizio, favorendone o sfavorendone la formazione e quindi promuovendo o inibendo l'attività della RNAP II.

Un determinato gene può essere regolato da uno specifico attivatore (definito *trans-acting factor*) soltanto se possiede nelle proprie regioni regolatorie la specifica sequenza di DNA (definita *cis-acting element*) riconosciuta e legata dall'attivatore medesimo. I diversi *cis-acting elements* presenti determinano il profilo di regolabilità del gene. Dato l'elevato numero di attivatori (e repressori) esistenti, è evidente che vi sia una grande varietà di combinazioni di *cis-acting elements* che rendono dissimili l'una dall'altra le regioni regolatorie dei diversi geni e quindi i relativi profili di espressione.

Tuttavia esistono aspetti spaziali e funzionali nell'organizzazione delle regioni che regolano la trascrizione che consentono l'identificazione di alcuni criteri unificanti.

Gli elementi del promotore minimo garantiscono il corretto posizionamento del complesso di pre-inizio

Le sequenze responsabili del corretto posizionamento della RNA polimerasi II e i siti da cui la trascrizione effettivamente inizia costituiscono il promotore minimo o "core promoter" (Figura 19.2). Sebbene la TATA-box sia importante per il legame di TFIID (contenente la TATA-box binding protein), la sua presenza è stata riscontrata solo nel 10-15% dei promotori finora analizzati, espressi in maniera tessuto-specifica. Vi sono geni che utilizzano, in alternativa o in aggiunta alla TATA-box, sequenze diverse conosciute come Inziatore (Inr) o DPE (*Downstream Promoter Element*). Promotori contenenti entrambi questi elementi regolano la trascrizione di geni abbondantemente espressi, mentre promotori che mancano della TATA-box, ma contenenti un inziatore, sono associati a geni espressi in maniera ubiquitaria, oncogeni, fattori di trascrizione. Il DPE è tipicamente associato a promotori privi di TATA-box (TATA-less) e richiede per la sua funzione la presenza dell'Inr a una distanza precisa, critica per l'attività trascrizionale. Anche nel caso in cui il core promoter sia sprovvisto di TATA-box, si ritiene che la TBP svolga comunque un ruolo fondamentale nella formazione del complesso di pre-inizio, pur non contattando direttamente il DNA. A monte e a valle della TATA-box si trovano altri elementi quali BREu e BREd,

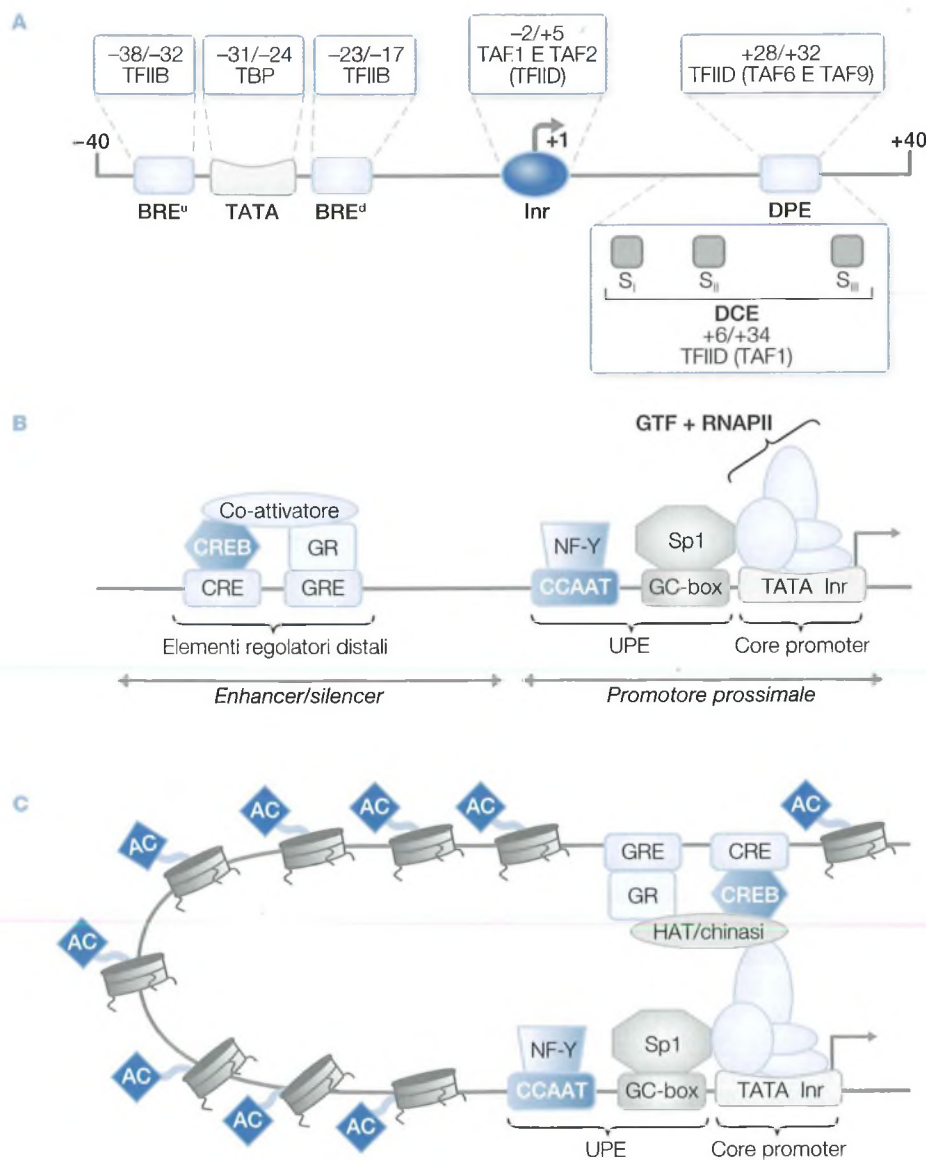


FIGURA 19.2 Il promotore di un gene comprende elementi regolatori distinti riconosciuti da fattori di trascrizione generali e specifici che garantiscono il corretto reclutamento della RNAPII. **A.** Il promotore minimo (core promoter) comprende le sequenze di DNA responsabili del posizionamento dell'RNA polimerasi determinando l'inizio della trascrizione (+1). In molti geni il core promoter contiene, oltre alla TATA-box, elementi di DNA diversi in grado a loro volta di interagire con il complesso dei fattori generali della trascrizione e dei TAFs. Questi elementi si possono trovare in una frazione di promotori in differenti combinazioni. Le proprietà di ogni promotore minimo sono dettate dalla presenza/assenza di questi elementi. Anche nel caso in cui il core promoter sia sprovvisto di TATA-box, la TBP, attraverso i suoi TAFs svolge comunque un ruolo fondamentale nella formazione del complesso di pre-inizio, pur non contattando direttamente il DNA. BRE^u: TFIIB Recognition Element upstream; BRE^d: TFIIB Recognition Element downstream; Inr: Initiator; DPE: Downstream Promoter Element; DCE: Downstream Core Element; TFIID, TFIIB: Transcription Factor II; TAF: TBP-associated factors. **B.** L'attività del promotore può essere aumentata dall'interazione di fattori di trascrizione ubiquitari con elementi in cis nella regione del promotore prossimale. A loro volta questi fattori esercitano un'azione di stabilizzazione del complesso di preinizio attraverso l'interazione con i fattori generali. La specificità e/o inducibilità dell'espressione di un gene viene ottenuta mediante il riconoscimento da parte di fattori di trascrizione specifici che legano regioni più distali del promotore (enhancer o silencer), che attraverso il reclutamento di co-attivatori o co-repressori portano a una modificazione degli istoni creando un ambiente favorevole o sfavorevole alla trascrizione. Questi co-attivatori possono ad esempio possedere anche attività chinasi che, inducendo la fosforilazione della coda carbossiterminale della RNA polimerasi II, stimola l'elongazione. **C.** Un modello comunemente accettato per spiegare l'interazione dei fattori legati agli enhancer con la RNAP II è la formazione di un loop da parte delle sequenze di DNA interposte tra il promotore minimo e le sequenze enhancer. UPE: *Upstream Promoter Elements*; CCAAT: CAAT-box; CREB: *Cyclic AMP Responsive Element Binding protein*; GRE: *Glucocorticoid Responsive Element*; GR: *Glucocorticoid Receptor*; HAT: *Histone Acetyl Transferasi*.

che sono siti di legame per TFIIB, e il DCE (*Downstream Core Element*) (Figura 19.2).

Altre sequenze contribuiscono alla regolazione dell'espressione genica e includono elementi prossimali e distali.

■ **Gli elementi della regione prossimale del promotore legano fattori di trascrizione ubiquitari**

Immediatamente a monte del core promoter (-40/-250 rispetto allo start di trascrizione) si trovano generalmente elementi per attivatori ubiquitari, quali la GC-box, che lega il fattore Sp1, e la CAAT-box, che può legare diversi fattori di trascrizione, tra cui NF-Y e NF-1 (Figura 19.2). L'insieme di queste sequenze, spesso chiamate UPE (*Upstream Promoter Elements*), e del core promoter costituisce il promotore propriamente detto. La GC-box spesso costituisce l'unico elemento presente nei promotori dei geni a espressione ubiquitaria e scarsamente regolabili; in questi casi, più di una copia di GC-box è presente in maniera tale che le diverse molecole di Sp1 legate possano avere un effetto sinergico sulla stabilizzazione del complesso di pre-inizio e garantire un livello sufficiente di trascrizione. Queste GC-box possono essere immerse in una regione del DNA altamente ricca in CG a costituire le "CpG island" il cui stato di metilazione influenza i livelli di espressione del gene. Regioni ipo-metilate corrispondono a promotori attivi, mentre regioni iper-metilate corrispondono a promotori inattivi (silenziati).

■ **Gli elementi distali del promotore, enhancer e silencer, legano fattori di trascrizione specifici che modulando lo stato di compattamento della cromatina promuovono o inibiscono l'accessibilità del complesso di pre-inizio al promotore**

Il genoma umano codifica per almeno 1700-1900 fattori di trascrizione sequenza-specifici. Queste proteine sono generalmente costituite da due domini, uno responsabile del riconoscimento e del legame a sequenze specifiche sul DNA (DNA-binding domain) e l'altro avente funzioni regolatorie (regulatory domain), la cui funzione primaria è quella di reclutare cofattori che posseggono un'attività di modificazione e rimodellamento della cromatina o che interagiscono direttamente con la RNAP II.

Condizione fondamentale perché la trascrizione abbia inizio è che il DNA sia accessibile all'interazione da parte dei fattori del complesso di pre-inizio. Il grado di compattamento della cromatina previene l'interazione del DNA con fattori di trascrizione; queste strutture devono venire decondensate e alterate in modo da rendere le regioni di DNA disponibili per il legame di fattori di trascrizione e di RNA polimerasi II (vedi oltre). Gli "enhancers" possono essere definiti come sequenze di DNA che servono a reclutare fattori di trascrizione che promuovono la decondensazione della cromatina che da stato represso passa a stato permissivo per la trascrizione e a facilitare l'assemblaggio del macchinario della trascrizione sul promotore. Gli elementi "silencers", al contrario, legano proteine e/o fattori che agiscono sulla cromatina inibendo l'espressione genica. Questi elementi si possono trovare anche fino a 100 kb di distanza dal promotore minimo

(Figura 19.2). Un modello comunemente accettato per spiegare come questi elementi così distanti dal core promoter possano interagire con la RNAP II è che sequenze di DNA interposte tra questi elementi regolatori possano formare un loop (Figura 19.2).

■ **Il complesso di pre-inizio necessita di ulteriori fattori che ne stabilizzino la struttura**

Sebbene la RNAP II e i GTF siano sufficienti a promuovere la trascrizione basale di un gene in sistemi ricostituiti in vitro, il complesso di pre-inizio è comunque una struttura labile, che si ritiene si formi in vivo parzialmente o raramente o con una brevissima emivita.

Una delle ipotesi più accreditate per spiegare a livello molecolare la funzione degli attivatori nello stimolare la trascrizione genica è quella della stabilizzazione del complesso di pre-inizio. Tuttavia, l'utilizzo di sistemi ricostituiti in vitro ha presto dimostrato che gli attivatori non sono in grado di stimolare la trascrizione basale sostenuta dal complesso di pre-inizio e che altri fattori devono essere coinvolti. Questo ha condotto alla scoperta dei co-fattori globali o generali che, virtualmente, svolgono la loro funzione nella trascrizione di ogni gene. I co-fattori sono proteine trascrizionali che non si legano direttamente al DNA, le quali formano una sorta di ponte tra l'attivatore/i e il complesso di pre-inizio, spesso stabilendo contatti con la TBP.

I co-fattori globali possono essere ricondotti a due grandi classi di proteine: i TAF e quelle che nel loro complesso costituiscono il Mediator.

Almeno 12 diverse isoforme di TAF sono state isolate dal lievito, da drosophila e dall'uomo e ciascuna di esse sembra possedere un certo grado di specificità per certi attivatori, mentre sull'altro versante il TAF prende generalmente contatto con TBP (Figura 19.3). Subito dopo la loro scoperta i TAF erano considerati dei co-fattori "puri", assolutamente richiesti per mediare gli effetti degli attivatori. Successivamente, è stato dimostrato che i TAF possono riconoscere direttamente elementi di DNA come l'Iniziatore (Inr) o il *Downstream Promoter Element* (DPE), svolgendo un ruolo fondamentale in tutti quei promotori che non possiedono una TATA-box (Figura 19.2). Inoltre, oggi si ritiene che il ruolo dei TAF sia meno universale di come inizialmente pensato, in quanto esistono promotori che non necessitano di essi per rispondere agli attivatori.

■ **Il Mediator: il più globale dei cofattori**

Il Mediator è un complesso multi-modulare che si forma dall'assemblaggio di proteine diverse (nell'uomo più di 25 con una massa globale di 1 MDa) in combinazioni e stechiometrie diverse. Il Mediator non contatta direttamente il DNA, come atteso per ogni co-fattore, e interagisce fisicamente con RNAP II, stimolando la fosforilazione del suo dominio carbossiterminale (CTD), un evento considerato essenziale per l'inizio e il procedere della trascrizione. Il Mediator, a seconda della specifica composizione in proteine, è capace di interagire sia con attivatori che con repressori trascrizionali, trasferendo l'informazione da essi al complesso di pre-inizio e alla

RNAP II (Figura 19.3). Il Mediator è comunque in grado di stimolare la trascrizione basale anche in assenza di attivatori, e per tale motivo è oggi considerato un elemento costitutivo del complesso di pre-inizio, insieme alla RNAP II e ai GTF (Figura 19.1).

La specificità e l'inducibilità dell'espressione genica sono garantite dalla presenza di co-fattori specifici che trasducono i segnali dall'ambiente extracellulare modulando selettivamente l'accessibilità al DNA dei fattori di trascrizione

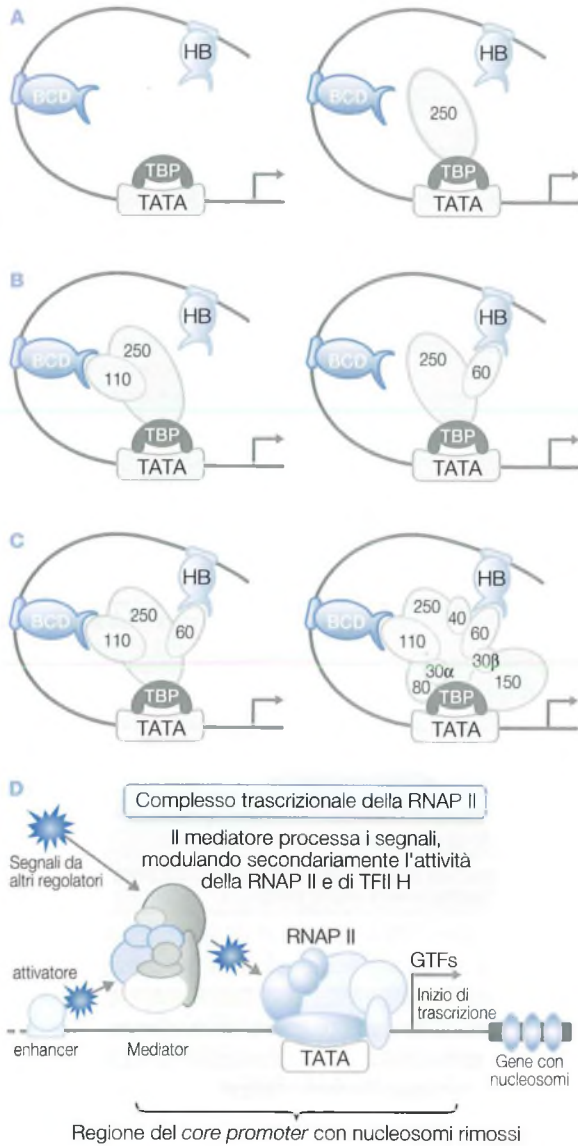


FIGURA 19.3 Ruolo funzionale dei TAF e del Mediator. Gli attivatori BCD e HB non possono stimolare la trascrizione del gene bersaglio in assenza degli specifici TAFs (TATA-box binding protein Associated Factors) (A). I TAFs, identificati mediante numeri corrispondenti ai loro pesi molecolari, mettono in collegamento gli attivatori con TBP, permettendo la stabilizzazione del complesso di pre-inizio. Gli attivatori BCD e HB possono stimolare la trascrizione separatamente (B) o insieme (C) in questo caso producendo un effetto sinergico. D. Il Mediator è un complesso multiproteico in grado di integrare diversi segnali trascrizionali indirizzandoli direttamente sulla RNAP II, con la quale interagisce fisicamente regolando lo stato di fosforilazione del suo dominio carbossiterminale. Il Mediator interagisce anche con altri componenti del complesso di pre-inizio.

La trascrizione di numerosi geni è un fenomeno finemente controllato in termini di tessuto-specificità e/o capacità di rispondere a stimoli extracellulare. Questo è dovuto alla presenza di elementi regolatori, quali enhancer e silencer, generalmente localizzati a monte del promotore, che legano attivatori (o repressori) tessuto-specifici e/o inducibili (Figure 19.2 e 19.3). Spesso questi fattori di trascrizione utilizzano per la loro attività dei co-fattori specifici, sia co-attivatori che co-repressori.

Inoltre, bisogna tenere presente che il DNA all'interno del nucleo non è "nudo", e quindi liberamente accessibile ai diversi fattori trascrizionali generali o promotore-specifici, ma è organizzato in una struttura nucleoproteica nota come cromatina. L'unità organizzativa fondamentale della cromatina è il nucleosoma, che consiste di 146 paia di basi di DNA arrotolato circa due volte attorno a un core proteico contenente due copie di ciascuna delle quattro proteine istoniche: H2A, H2B, H3, H4 (Figura 19.2C). La trascrizione richiede che il DNA sia accessibile ai GTF, alla RNAP II e agli attivatori sequenza-specifici e che la doppia elica si denaturi e, successivamente, rinaturi per tutta la lunghezza del trascritto: la struttura compatta della cromatina è in grado di impedire ognuno di questi processi, rendendo la trascrizione impossibile. È pertanto evidente che il presupposto per la trascrizione di un gene sia la riorganizzazione della cromatina, con particolare riferimento alla sua unità fondamentale, il nucleosoma. I co-fattori sono in grado di modificare la struttura della cromatina e quindi di favorire o inibire l'accesso delle diverse proteine trascrizionali al DNA.

I co-fattori specifici, come i co-fattori globali, non contattano direttamente il DNA, ma poiché i promotori di numerosi geni sono regolati sia da attivatori ubiquitari come Sp1, che opera attraverso il Mediator, che da attivatori specifici, i due complessi spesso coesistono e cooperano nella regolazione della trascrizione. È anzi possibile che il medesimo attivatore (o repressore) sullo stesso promotore comunichi contemporaneamente con il suo specifico co-fattore e con i co-fattori globali.

Molti di questi co-fattori specifici sono stati identificati studiando i recettori intracellulari, che sono responsabili della modulazione dell'espressione di determinati geni in risposta a stimoli extracellulare, spesso di natura ormonale (vedi Capitolo 20 e oltre).

A oggi sono stati identificati più di 300 co-fattori specifici, associati a numerose funzioni fisiologiche e la cui alterata attività è correlata a stati patologici diversi, rendendo questi fattori possibili nuovi bersagli per lo sviluppo di nuove terapie, soprattutto applicate ai tumori (Tabella 19.1; vedi CD: Approfondimento 19.1: Farmacoepigénomica). Sebbene inizialmente si sia ritenuto che questi fattori mancassero di un determinante strutturale unificante, in realtà l'analisi della loro sequenza ha per-

TABELLA 19.1 Co-fattori della regolazione dell'espressione genica*

Co-fattori	Attività	Funzione fisiologica	Difetto patologico	Sindrome patologica	Terapia
CBP/p300	Istone acetiltransferasi		Difetti in acetilazione del DNA	Rubinstein-Taybi syndrome, ritardo mentale, difetto di crescita, anomalie scheletriche, alterata memoria a lungo termine	Inibitori HDAC per controbilanciare la mancata acetilazione degli istoni dovuta alla mancanza di attività acetiltransferasica
HDAC5	Deacetilasi istonica		Coinvolta in depressione		Inibitori HDAC
MECP2	Recluta HDACs			Rett syndrome	nd
SRC-3	I complessi contengono diverse attività, chinasi, ubiquitina ligasi, ATPasi, metiltransferasi, acetilasi	Coinvolto in espressione geni regolati da recettore estrogeni	Amplificato in tumori dipendenti da steroidi (cancro della mammella); conferisce resistenza a tamoxifene		nd
PGC-1 a	nd Agisce da piattaforma per reclutamento di altri co-fattori, come HDAC della famiglia delle sirtuine	Ruolo in metabolismo energetico, biogenesi dei mitocondri, ossidazione acidi grassi, stimola gluconeogenesi	Diabete tipo 2, sindrome dell'ovaio policistico		Trattamento dei disturbi metabolici attraverso la modulazione delle sirtuine: resveratrolo
E6-AP coattivator			Angelman syndrome		
Sirtuine	HDAC		Sindrome metabolica		Resveratrolo attivatore di SIRT1 e migliora le funzioni metaboliche
p160	HAT	Sviluppo organi riproduttivi, metabolismo, crescita	Espressione aberrante in diversi tumori (mammella, prostata, ovaio)		Sono oggetto di studi peptidi che possano interferire con il legame recettore/co-fattore (vedi Box 1)
LSD1	Demetilasi		Espressione alterata in diversi tumori (ad esempio, prostata)	Inibitori identificati in piccole molecole che inibiscono monoamino e poliamino ossidasi omologhe a LSD1	

*I co-fattori sono componenti fondamentali nella regolazione dell'espressione genica e l'alterazione della loro attività e/o espressione porta all'insorgenza di patologie. MECP2: Metil-CpG-binding protein; CBP/p300: cAMP enhancer binding protein binding protein

messo di associare a queste proteine una grande varietà di attività enzimatiche diverse, che rendono questi fattori non soltanto delle molecole aventi una funzione strutturale di ponte tra gli attivatori e i repressori trascrizionali e il complesso di pre-inizio, ma piuttosto degli elementi fondamentali nel controllo fine della trascrizione. Inoltre, i co-regolatori svolgono la loro attività organizzati in grossi complessi multiproteici, in cui più di un'attività enzimatica può essere presente (Tabella 19.2). La capacità di formare complessi multiproteici rende questi fattori capaci di trasdurre in maniera precisa e controllata i segnali dall'ambiente circostante aumentando ulteriormente la complessità della risposta e permettendo una modulazione sia temporale che tessuto-specifica di ogni singolo gene.

I co-regolatori possono essere classificati in due gruppi in accordo con il loro modo d'azione.

Il primo gruppo contiene fattori che modificano in maniera covalente gli istoni (acetilazione/deacetilazione,

metilazione/demetilazione, fosforilazione/defosforilazione, ubiquitilazione/deubiquitilazione, sumoilazione, e ADP-ribosilazione).

Il secondo gruppo include fattori che rimodellano la cromatina in maniera ATP-dipendente e modulano l'accessibilità ai promotori dei fattori di trascrizione e al macchinario basale della trascrizione (vedi sotto). Altri fattori giocano un ruolo fondamentale nell'assemblaggio e reclutamento o rilascio dei complessi di co-regolazione. I primi co-regolatori clonati sono stati SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator*), N-CoR (*Nuclear Receptor Corepressor*) e SMRT (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptor*). Spesso i co-regolatori non presentano una specificità per un particolare fattore di trascrizione, ma influenzano in maniera pleiotropica la trascrizione di una gran parte di geni. La specificità della loro azione è dovuta alla regolazione della loro attività mediante modificazioni post-traduzionali, come ad esempio fosforilazione, metilazione e acetilazione in risposta a stimoli extracellulari

TABELLA 19.2 I complessi dei co-regolatori*

Co-fattore	Complesso	Attività enzimatica/ funzione
BRG1	SWI/SNF	ATP-asi
CoREST	CoREST	nd
CTBP1, CTBP2	CoREST	Deidrogenasi NAD-dipendente
HDAC1, HDAC2	SIN3, NURD, CoREST	Deacetilazione
HDAC3	NCoR, SMRT	Deacetilazione
HDAC4-HDAC11	§	Deacetilazione
LSD1	CoREST, NURD	H3K4 demetilazione
NCoR, SMRT	NCoR, SMRT	nd
SIN3	SIN3, CoREST	nd
SIRT1-SIRT5	§	D-acetilazione NAD-dipendente

*I complessi dei co-fattori posseggono più attività enzimatiche, permettendo modificazioni epigenetiche coordinate. NCoR e SMRT presentano un'elevata omologia di sequenza a livello della proteina e i loro complessi posseggono attività simili e sono sempre stabilmente associati a HDAC3, responsabile dell'attività deacetilasi associata agli eventi di repressione di questi complessi.

nd: nessuna specifica attività enzimatica descritta; §: non è stata descritta associazione con nessuno dei grandi complessi di corepressione maggiori. BRG1: BRM/SWI2-related gene 1; CoREST: co-repressor for RE1 silencing transcription factor; CTBP2: Carboxy-Terminal-Binding Protein; SWI/SNF: switch/sucrose non-fermentable; LSD1: Lysine-Specific histone Demethylase; NURD: Nucleosome Remodelling and histone Deacetylation; NCoR: Nuclear receptor Co-Repressor; SMRT: Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor; SIRT: Sirtuin

diversi: le modificazioni a carico di ogni singolo fattore costituiscono un codice molecolare che controlla l'attività trascrizionale dei co-attivatori e la loro interazione con i diversi fattori di trascrizione. I co-regolatori sono quindi al centro del coordinamento di vasti programmi trascrizionali coinvolti nella crescita, nel differenziamento e nelle funzioni metaboliche (ad esempio, PGC-1 α nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi), fungendo da integratori delle vie di trasduzione del segnale. Ad esempio, la fosforilazione di N-CoR e SMRT controlla la loro localizzazione intracellulare, dal nucleo al citoplasma, impedendo quindi di reprimere la trascrizione, mentre la fosforilazione di SRC3, a opera di proteinchinasi come I κ B α e/o CDK2, definisce la sua associazione con altri membri del complesso come le acetil-transferasi istoniche p300 e CBP o la metil-transferasi CARM1, influenzando anche l'affinità per il fattore di trascrizione e quindi influenzando l'espressione dei suoi geni target. Queste modificazioni influenzano anche la stabilità di queste proteine; l'attività dei co-regolatori viene quindi regolata anche a livello della degradazione della proteina via proteasoma, con meccanismi sia ubiquitina-dipendenti che indipendenti. Molti co-attivatori posseggono essi stessi un'attività E2 ed E3 ubiquitina ligasi (vedi Capitolo 25).

■ I complessi co-regolatori modificatori degli istoni

Questa classe di complessi è composta da elementi in grado di modificare covalentemente gli istoni al loro N-terminale attraverso reazioni di acetilazione, fosforilazione e metilazione. L'acetilazione è certamente il

meccanismo meglio caratterizzato e già 40 anni fa era noto che la iperacetilazione delle lisine a livello delle "code" N-terminali degli istoni era coinvolta nell'attivazione della trascrizione.

I meccanismi attraverso i quali l'acetilazione favorisce la trascrizione sono probabilmente molteplici. Primo fra tutti, la riduzione della carica sulla lisina che probabilmente destabilizza l'interazione istone/DNA, smascherando le sequenze nucleosomali. Poiché i nucleosomi interagiscono tra di loro attraverso le code degli istoni, è anche possibile che la distruzione di questa sovrastruttura possa contribuire o addirittura anticipare la decompattazione della cromatina. Lo stato di acetilazione di un gene, e in particolare del suo promotore, è il risultato dell'azione opposta di due complessi: l'istone acetiltransferasi (HAT) e l'istone deacetilasi (HDAC). Le HAT a localizzazione nucleare comprendono tre famiglie di proteine: GNAT, MYST e P300; le famiglie GNAT e MYST includono più di un membro. Tutte le proteine appartenenti alle HAT nucleari possiedono una regione di legame per l'acetil-CoA estremamente conservata e sono singolarmente attive sugli istoni in vitro. Tuttavia, in vivo, esse operano in complessi multiproteici cooperando con numerose proteine accessorie. Sulla base della composizione, sono stati identificati distinti complessi HAT ciascuno con diversa specificità per gli istoni e con diversa funzione biologica. La famiglia delle HDAC, nei vertebrati, è composta da 11 membri (HDAC1-HDAC11), suddivisi in tre sottoclassi: classe I (HDAC 1-HDAC 3 e HDAC 8), classe II (HDAC 4- HDAC 7, HDAC 9 e HDAC 10) e classe IV (HDAC11). La classe III è composta dalla famiglia delle sirtuine, deacetilasi NAD dipendenti. HDAC1 e HDAC2, che appartengono alla prima classe, sono state trovate insieme in due complessi multiproteici noti come Sin3 e NuRD, i quali comprendono a loro volta altre proteine; Sin3 e NuRD sono stati trovati frequentemente associati a repressori trascrizionali, confermando che uno dei meccanismi di spegnimento o di inibizione della trascrizione prevede la deacetilazione degli istoni con conseguente aumento delle interazioni con il DNA. La combinazione di queste modificazioni a carico degli istoni costituisce un codice (histone code) in grado di dirigere specifici e distinti programmi trascrizionali.

■ I complessi co-regolatori ATP-dipendenti

I complessi ATP-dipendenti utilizzano l'energia derivata dall'idrolisi dell'ATP per promuovere lo "slittamento" del nucleosoma esponendo o mascherando specifiche sequenze di DNA. I complessi ATP-dipendenti sono strutture multiproteiche con una subunità centrale dotata di attività ATPasica e numerose proteine accessorie. Tre distinte famiglie di rimodellatori ATP-dipendenti sono state identificate nell'uomo e in altre specie (SWI2/SNF2, ISWI e Mi-2) sulla base della struttura della subunità centrale, e diverse evidenze suggeriscono che i diversi complessi utilizzino meccanismi distinti per favorire il rimodellamento della cromatina. Un ruolo ipotizzato per le proteine accessorie è quello di promuovere la localizzazione dei complessi a livello di specifici promo-

tori attraverso l'interazione con specifici attivatori. Un attivatore tessuto-specifico, la cui sequenza è localizzata sul DNA linker (cioè il DNA tra due nucleosomi) ed è quindi accessibile, legandosi a essa recluta un complesso ATP-dipendente, il quale smascherando le sequenze nucleosomali necessarie per il legame della TBP, degli attivatori ubiquitari come Sp1, promuove la formazione del complesso di pre-inizio e quindi la trascrizione del gene (Figura 19.4). Questa cascata di eventi è stata dimostrata per MyoD, un attivatore trascrizionale essenziale per l'espressione di geni specifici del muscolo schele-

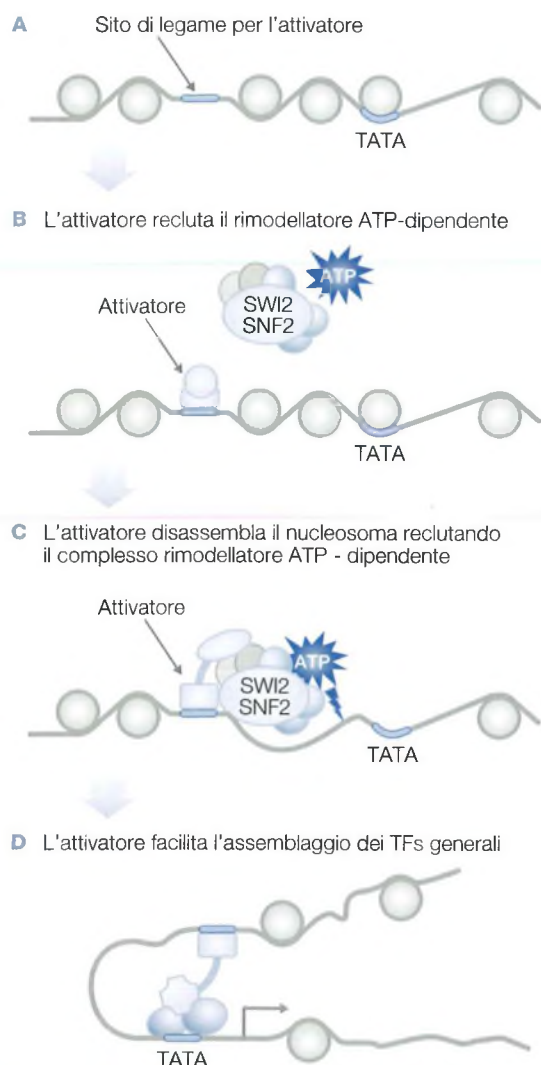


FIGURA 19.4 Regolazione dell'espressione genica da parte di complessi rimodellatori della cromatina ATP-dipendenti. **A.** In condizioni basali il gene non è trascrivibile perché il core promoter, con particolare riferimento alla TATA-box, è mascherato nei nucleosomi. La sequenza per l'attivatore è però accessibile. **B-C.** L'attivatore legandosi recluta il complesso ATP-dipendente SWI2/SNF2 che provoca lo slittamento del nucleosoma, smascherando la TATA-box e consentendo la formazione del complesso di pre-inizio. **D.** In questo esempio l'attivatore successivamente prende contatti con il complesso di pre-inizio. In altri casi l'attivatore, attraverso i complessi rimodellatori ATP-dipendenti, svolge esclusivamente funzioni nell'ambito della riorganizzazione della cromatina.

trico e quindi dell'intero processo di differenziamento di questo tipo cellulare. Il reclutamento del complesso SWI/SNF è stato anche dimostrato nel caso dei recettori dei glucocorticoidi e degli estrogeni, indicando che il rimodellamento ATP-dipendente della cromatina è un meccanismo di controllo impiegato anche nella regolazione della trascrizione da stimoli extracellulari.

Verso una teoria unitaria della regolazione della trascrizione

Tutti i processi di regolazione finora descritti non operano in maniera indipendente e separata gli uni dagli altri, ma anzi un elevato grado di integrazione tra di essi è spesso il dato comune che emerge dagli studi più recenti. Ad esempio, i due complessi modificatori della cromatina agiscono frequentemente insieme con un ordine che è diverso a seconda del gene considerato. Una situazione del tutto particolare è poi quella che riguarda il complesso modificatore NuRD che contiene sia HDAC1 e HDAC2 che Mi-2, cioè una subunità centrale di un complesso ATP-dipendente. In altri termini NuRD è capace di svolgere le due principali forme di modificazione della cromatina, appartenendo contemporaneamente ai due principali tipi di complessi.

Considerando poi il caso degli attivatori (o dei repressori), essi possono regolare la trascrizione esclusivamente reclutando modificatori della cromatina, e quindi smascherando (o mascherando) sequenze di DNA per fattori ubiquitari, o possono essi stessi, successivamente, prendere contatto con il complesso di pre-inizio, sia attraverso co-fattori globali che co-attivatori specifici o essere essi stessi dei modificatori: è questo ad esempio il caso di CBP/p300, originariamente descritto come co-attivatore e solo successivamente caratterizzato per le sue proprietà enzimatiche di acetilasi (Figura 19.5).

Le strategie per regolare la trascrizione sono quindi molteplici, ma tutte devono comunque condurre al medesimo evento finale: la formazione di un complesso di pre-inizio stabile, posizionato correttamente sul gene, che consenta alla RNAP II di iniziare la sintesi dell'RNA messaggero.

Trascrizione inducibile da stimoli extracellulari

Da un punto di vista generale, la trascrizione costituisce un processo estremamente complesso che offre però numerose opportunità di intervento farmacologico, con l'intento di aumentare o diminuire l'espressione di determinati geni coinvolti in processi patologici. Sebbene esistano cascate di eventi trascrizionali apparentemente poco influenzabili da stimoli extracellulari, come certi processi ontogenetici che appaiono riflettere esclusivamente l'esecuzione di un programma genetico intrinseco, la grande proprietà del genoma è proprio quella di adattare la propria attività in risposta alle informazioni e alle richieste provenienti dall'ambiente esterno, modificando la trascrizione di determinati geni. Ciò può accadere perché l'espressione o la funzionalità di molti attivatori (e

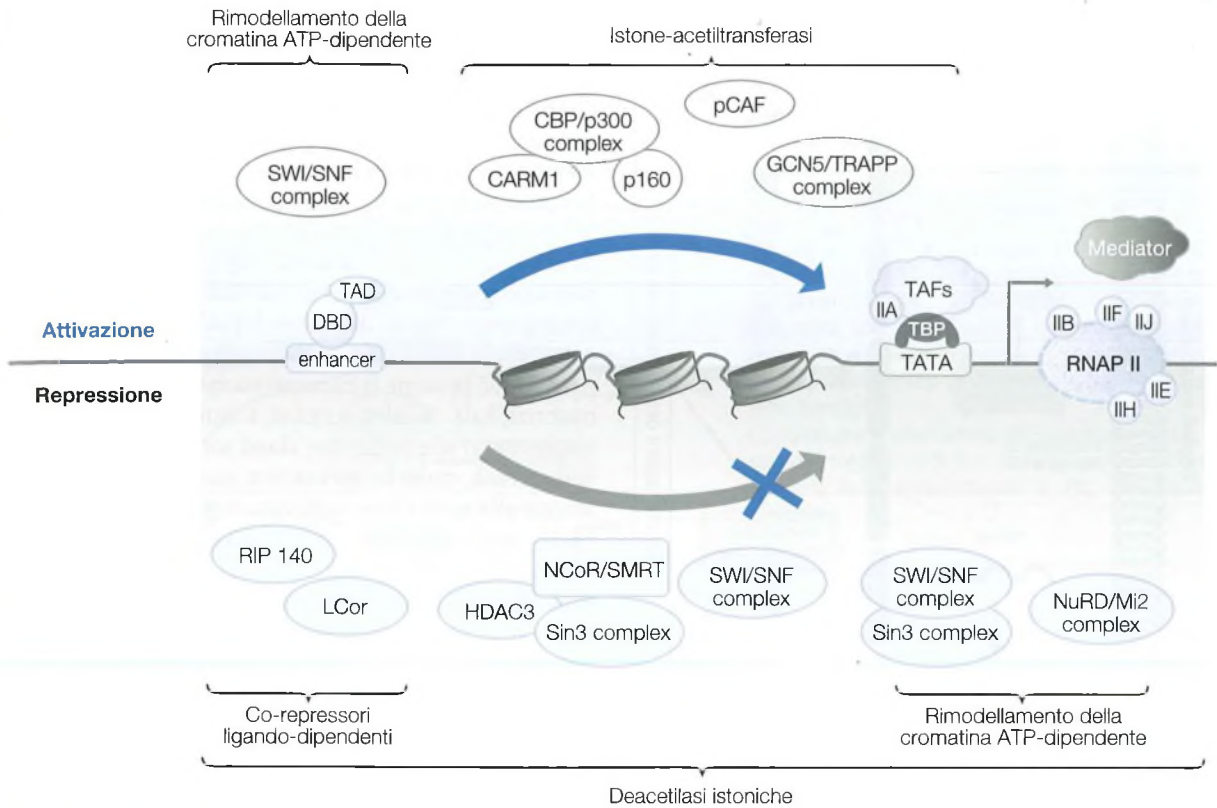


FIGURA 19.5 Modello generale della regolazione dell'espressione genica. La regolazione di un gene richiede l'integrazione delle attività di diversi fattori. Il riconoscimento di specifiche sequenze nella regione regolatoria di un gene da parte di fattori di trascrizione generali e/o tessuto-specifici è seguito dal reclutamento di un vasto numero di complessi co-regolatori. Complessi co-attivatori includono fattori che contengono attività di rimodellamento della cromatina, istone-arginina metiltransferasi, istone-acetiltransferasi, e componenti del complesso Mediatore che media l'interazione con il complesso di pre-inizio. Dall'altra parte i co-repressori includono complessi con attività di rimodellamento della cromatina, co-repressori basali, quali NCoR e SMRT, che fungono da piattaforma per il reclutamento di altri complessi con attività istone deacetilasi. Specifici co-repressori, quali LCoR (*Ligand-dependent nuclear receptor CoRepressor*) e RIP140 (*Receptor-Interacting Protein 140*) per i recettori nucleari, reclutano altri co-repressori generali. Un'accurata ed efficiente regolazione dell'espressione genica negli eucarioti è quindi il risultato dell'azione di due forze molecolari opposte che, a seconda dei segnali che arrivano dall'ambiente circostante, prevalgono verso l'attivazione o la repressione di un determinato numero di geni.

repressori), così come dei co-fattori, è regolata da stimoli extracellulari, rendendo la trascrizione dei corrispondenti geni-bersaglio "sensibile" alle informazioni provenienti dall'ambiente esterno e finemente regolata sulla base delle richieste funzionali della cellula.

Esistono tre classi di fattori di trascrizione inducibili

Sulla base dei meccanismi molecolari con cui queste proteine vengono attivate, è possibile riconoscere almeno tre distinte classi di fattori di trascrizione inducibili: fattori attivati da ligando, fattori attivati da modificazioni post-traduzionali e fattori la cui espressione, e quindi attività, è regolata a livello trascrizionale (Figura 19.6).

Alla prima classe di fattori di trascrizione appartengono i recettori per gli ormoni steroidei, che saranno estesamente descritti nel Capitolo 20.

Alla seconda classe appartengono fattori di trascrizione la cui attivazione è dipendente da modificazioni post-traduzionali, generalmente correlate allo stato di fosforilazione di specifici residui di treonina e serina. Tali

residui sono il substrato di proteinchinasi attivate da sistemi di secondi messaggeri quali la PKA, la PKC, le chinasi calcio-calmodulina dipendenti, le MAP chinasi, così come di fosfatasi quali la calcineurina (si veda il caso del fattore NF-AT). A questa classe appartiene CREB (*Cyclic AMP Responsive Element Binding protein*) la cui attivazione rende la trascrizione di alcuni geni sensibile alle variazioni intracellulari della concentrazione di AMP ciclico (Figura 19.7).

Se si considera l'elevato numero di recettori accoppiati a proteine Gs, che attivano l'adenilato ciclasi, è facile comprendere come numerosi farmaci che ne bloccano l'attività interferiscano in ultima analisi con l'attività del genoma, inibendo l'espressione di geni dipendenti da CREB. Un esempio interessante riguarda i β -bloccanti, impiegati nel trattamento dello scompenso cardiaco che interferiscono con i processi di rimodellamento cardiaco anche attraverso il blocco dell'attività di CREB.

Una sottoclasse particolare di regolatori della trascrizione attivati da modificazioni post-traduzionali è quella composta dalle proteine STAT (*Signal Transducer and*

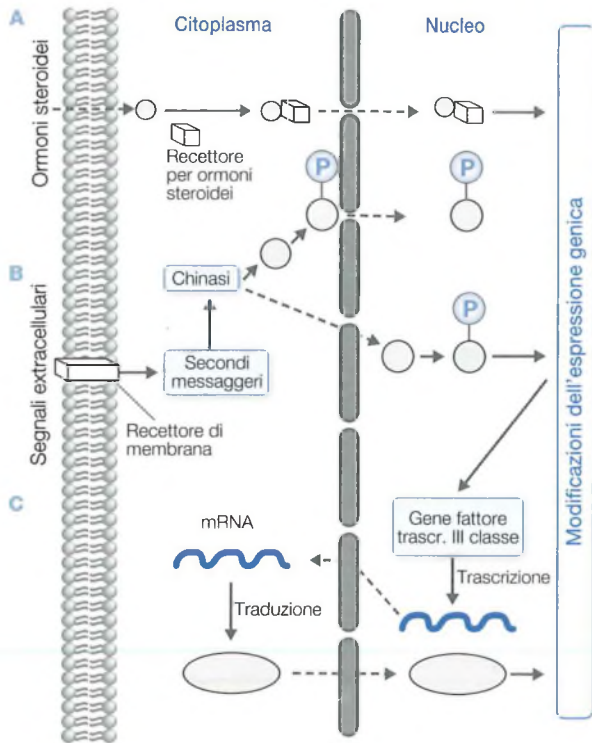


FIGURA 19.6 Meccanismi di regolazione della trascrizione da stimoli extracellulari. Le frecce con la linea continua indicano un rapporto di causa-effetto; le frecce con la linea tratteggiata indicano effettivi spostamenti di molecole tra diversi compartimenti. Sono rappresentate le tre classi di fattori di trascrizione che rispondono a stimoli extracellulari. **A.** Alla classe I appartengono fattori la cui attivazione dipende dall'interazione con un ligando. Appartengono a questa classe i recettori per gli ormoni steroidei. L'interazione ligando-recettore può avvenire nel citoplasma, come mostrato, o direttamente nel nucleo dove alcuni recettori di questa superfamiglia normalmente risiedono (ad esempio, il recettore per gli ormoni tiroidei). **B.** Alla II classe appartengono fattori di trascrizione la cui attivazione dipende dallo stato di fosforilazione di residui di serina, treonina o tirosina. Nella figura non è indicato il ruolo delle fosfatasi, ma anche la defosforilazione può essere un segnale di attivazione. Vi sono fattori di trascrizione che vengono fosforilati nel citoplasma e quindi migrano nel nucleo (come le proteine STAT), oppure fattori che vengono fosforilati nel nucleo, previa migrazione della chinasi (come CREB). I fattori della II classe, oltre a regolare l'espressione di numerosissimi geni con le più diverse funzioni, regolano anche l'espressione dei fattori di trascrizione della III classe. **C.** I fattori di trascrizione appartenenti alla III classe non sono infatti espressi costitutivamente, ma la trascrizione dei loro geni è indotta ex novo dai fattori della II classe come CREB. Una volta che la proteina della III classe è stata sintetizzata, entra nel nucleo e regola a sua volta l'espressione di numerosi geni. L'emivita delle proteine trascrizionali della III classe, così come quella degli RNA messengeri che le codificano, è molto breve (dai 15' alle 3 ore), in maniera tale che il "sistema" ritorna in condizioni basali rapidamente.

Activator of Transcription). L'attivazione di questi fattori, che si trovano in forma latente nel citoplasma, è dovuta a fosforilazione su residui *tirosinici* con conseguente dimerizzazione, per riconoscimento reciproco delle fosfotirosine da parte di domini SH2 di cui le proteine STAT

sono dotate, e migrazione nel nucleo. La fosforilazione dei residui *tirosinici* può essere direttamente attuata da recettori di membrana con attività *tirosinchinasi* intrinseca (ad esempio, EGF-R) o dalle JAK, la cui attivazione dipende dalla stimolazione di recettori di membrana per le citochine.

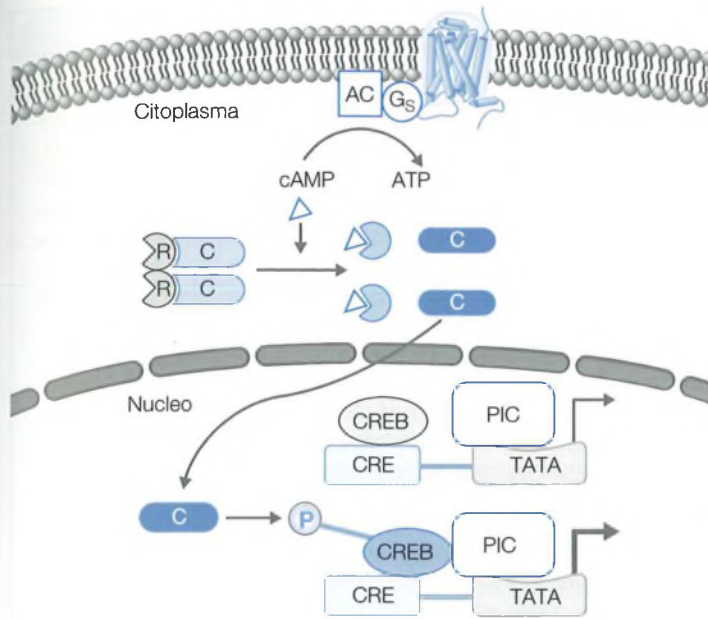
Un caso particolare di regolazione post-traduzionale di un fattore di trascrizione è quello che riguarda NF- κ B, in cui è la proteina inibitoria I κ B a essere modificata post-traduzionalmente, mediante una fosforilazione, con conseguente rilascio del fattore NF- κ B.

Alla terza classe dei fattori di trascrizione inducibili appartengono proteine la cui espressione è regolata a livello trascrizionale. In altri termini, i fattori di trascrizione appartenenti alle prime due classi sono sempre presenti nella cellula, ma in forma inattiva, mentre i fattori appartenenti alla terza classe non sono espressi in condizioni basali, ma lo diventano, in risposta a opportuni stimoli, per induzione della trascrizione dei relativi geni. I neosintetizzati RNA messengeri migrano quindi nel citoplasma, dove avviene la sintesi proteica, vengono tradotti e le relative proteine ritornano nel nucleo a regolare la trascrizione degli specifici geni bersaglio. L'induzione dell'espressione dei fattori di trascrizione appartenenti alla terza classe è quasi sempre dovuta a fattori di trascrizione appartenenti alla seconda classe.

Alla terza classe di fattori appartengono c-fos, fra-1, fra-2 (fra: fos related protein), fos-B, c-Jun, Jun-B, Jun-D, krox-20 e krox-24. Alcuni di questi fattori di trascrizione, come c-fos, sono proto-oncogeni, cioè proteine che, se mutate o sovraesprese, partecipano ai processi di immortalizzazione e trasformazione cellulare all'origine delle neoplasie. In condizioni fisiologiche molti degli stimoli extracellulari che determinano l'espressione di questi fattori di trascrizione sono fattori di crescita. Tuttavia l'espressione di queste proteine trascrizionali può essere indotta anche da stimoli diversi, quali neurotrasmettitori, ed è stata dimostrata in svariate situazioni fisiologiche e patologiche, dai processi cellulari che nel SNC presidono all'apprendimento e alla memoria, a situazioni di insulto ischemico cerebrale o convulsioni.

Dalla farmacologia della trascrizione alla farmacoepigénomica

Dalla prima divisione cellulare gli organismi multicellulari devono regolare l'espressione genica in maniera precisa per assicurare un corretto svolgimento dei programmi genetici di sviluppo e differenziamento dei tessuti, così come di mantenimento dell'omeostasi cellulare, rispondendo a una varietà di stimoli extracellulari. La precisa regolazione della trascrizione genica dipende dal contesto del promotore, dal ciclo cellulare e da segnali induttivi. Ogni evento di attivazione e/o repressione trascrizionale si esplica attraverso la combinazione dell'attività di molti elementi regolatori che coinvolge l'interazione di molteplici fattori, incluso la RNA polimerasi II e i GTFs nella formazione del PIC,

**FIGURA 19.7** Meccanismo di attivazione di CREB.

L'attivazione di un recettore di membrana accoppiato positivamente all'adenilato ciclasi, mediante una G proteina stimolatoria, produce un aumento della concentrazione intracellulare di AMP ciclico. Quest'ultimo, legandosi alle subunità regolatorie della proteinkinasi A, promuove la dissociazione delle subunità catalitiche, che, migrando nel nucleo, fosforilano il fattore di trascrizione CREB (*Cyclic-AMP Responsive Elements Binding-protein*). CREB è legato alle sue specifiche sequenze di DNA anche in condizioni basali, ma non è in grado di stimolare la trascrizione. La fosforilazione determina una modificazione conformazionale del fattore che lo rende competente per interagire con il complesso d'inizio e stimolare la trascrizione del gene bersaglio.

G_s: G-proteina stimolatoria; AC: adenilato-ciclasi; R: subunità regolativa della proteinkinasi A; C: subunità catalitica della proteinkinasi A; PIC: *Pre-Initiation Complex*.

attivatori e repressori trascrizionali specifici che interagiscono con gli enhancer e i silencers, e co-fattori che rimodellano e/o modificano la cromatina, ognuno dei quali da solo non sarebbe sufficiente per una corretta e completa attivazione del programma trascrizionale. La scoperta che alla base di molte patologie vi sia un'alterazione dell'espressione di numerosi geni, come emerso dai numerosi studi condotti sul trascrittoma mediante microarrays di RNA, ha dato un nuovo impulso allo sviluppo di strategie terapeutiche fondate sull'interferenza diretta con i fattori del macchinario trascrizionale, con l'obiettivo di ripristinare una corretta espressione dei geni. Sul piano teorico, tale interferenza può realizzarsi a livello di fattori di trascrizione, e infatti in terapia già esistono farmaci che agiscono direttamente su fattori di trascrizione (si pensi ai diversi farmaci per i recettori intracellulari, ma anche alla ciclosporina e al tacrolimus), o a livello di cofattori, spesso coinvolti nelle modificazioni covalenti degli istoni o nello stato di metilazione del DNA che, come detto, grandemente influenzano l'espressione di un gene. Le modificazioni della cromatina e lo stato di metilazione del DNA costituiscono gli elementi portanti della regolazione epigenetica (vedi CD: Approfondimento 19.1). Sebbene sul piano didattico sia parso utile trattare separatamente i due argomenti, è evidente come sia

l'approccio epigenomico che quello più diretto di interferire con l'attivazione di fattori di trascrizione, come diffusamente discusso nel Capitolo 20, debba produrre come effetto finale un ripristino della corretta espressione dei geni coinvolti in una determinata patologia e come pertanto la farmacologia della trascrizione e la farmacoepigénomica costituiscano aspetti complementari di una medesima problematica, destinati a sovrapporsi in maniera sempre più completa.

Allo stato attuale, è possibile affermare che l'approccio farmacoepigénomico è ancora scarsamente mirato, fondandosi sull'interferenza con meccanismi generali e generalizzati di controllo dell'espressione genica (acetilazione, metilazione ecc.), mentre la farmacologia della trascrizione, che in buona parte coincide con la farmacologia dei recettori intracellulari, si basa sull'uso di composti con una specificità molto più elevata, propria della farmacologia recettoriale classica. Un'interessante situazione intermedia è illustrata nel Box 1 dove è descritta una classe di modulatori sintetici che interferisce con uno specifico coattivatore dotato di attività acetiltransferasica e dalla quale si evince chiaramente come una migliore comprensione dei meccanismi di regolazione genica offra spunti fondamentali per la ricerca di nuovi farmaci.

BOX 1 Modulatore sintetici dell'attivazione della trascrizione: il caso di CBP/p300

L'attività dei fattori trascrizionali può essere modulata interferendo sia a livello del legame alla sequenza consenso sul DNA (attraverso il DNA binding domain) sia bloccando l'interazione tra il dominio di trans-attivazione (TAD) con altre proteine, similmente co-attivatori, mediante l'utilizzo di molecole strutturalmente simili al TAD. Nel primo caso, molti composti non naturali in grado di interferire con il DBD in sistemi in vitro e in colture cellulari sono stati già individuati (Tabella 19.3). Più difficile è stata la scoperta di molecole che inibissero l'interazione con il TAD. Di solito l'attività del TAD è regolata da proteine, rimosse in seguito a stimoli induttivi, che mascherano il sito di interazione con co-attivatori. Tra gli inibitori finora identificati vi sono piccole molecole o peptidi che mimano il dominio di trans-attivazione competendo per il legame tra TAD e co-attivatori. L'esempio più riuscito è quello relativo all'identificazione di inibitori del TAD di fattori che interagiscono con il co-attivatore CBP/p300, una istone acetil-transferasi. CBP, e il suo omologo p300, interagiscono con più di 100 fattori di trascrizione, molti dei quali implicati nel cancro. La modulazione dell'attività di CBP/p300 ha assunto quindi un grande interesse terapeutico. Un esempio viene dal fattore HIF-1 α , un recettore intracellulare che regola la risposta a ipossia inducendo l'espressione di geni come il VEGF e di metallo proteasi, contribuendo attraverso l'angiogenesi alla progressione del cancro e alla migrazione metastatica di cellule tumorali. HIF-1 α interagisce con CBP/p300 e riuscire a bloccare questa interazione potrebbe rivelarsi una buona strategia per bloccare i processi di metastasi e sviluppo del tumore. Uno screening high-throughput ha permesso di identificare un prodotto naturale, la chetomina, come inibitore di questa interazione. Questo composto, sebbene blocchi l'attività trascrizionale di HIF-1 α in modelli cellulari, tuttavia si è dimostrato tossico in modelli animali. Un suo derivato sintetico, ETP-3, ha mostrato una ridotta tossicità. La difficoltà a oggi di utilizzare questi composti in terapia viene però dal fatto che essendo CBP/p300 un co-attivatore generale, bloccarne l'azione si riflette in un'alterata espressione di 403 geni, di cui 113 controllati direttamente da HIF-1 α . Nonostante l'attività pleiotropica che i co-fattori hanno sulla regolazione dell'espressione genica possa essere a oggi una limitazione, studi futuri mirati ad aumentare le conoscenze dei meccanismi di interazione tra fattori di trascrizione e co-fattori, attraverso anche studi strutturali, costituiscono una grande sfida per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche in diverse patologie la cui eziogenesi è strettamente associata a un'alterata regolazione della trascrizione.

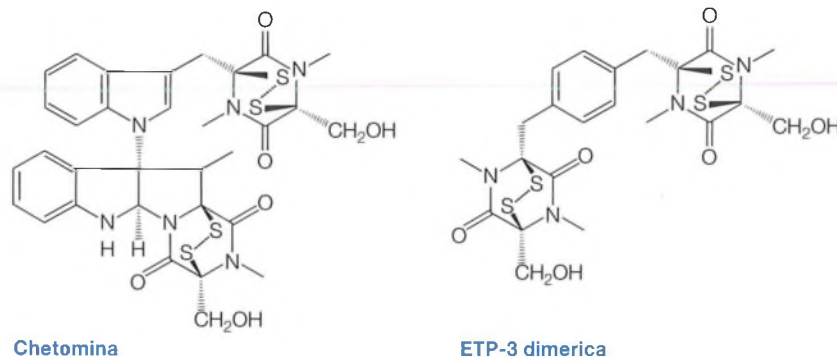


TABELLA 19.3 Composti in grado di interferire con il legame al DNA di fattori di trascrizione

Gene	Molecola	Attività	IC50	Effetto biologico
c-Myc	Peptide mimetico IIA6B17	Inibizione della formazione del dimero c-Myc-Max	28 μ M	Inibizione della trascrizione di un gene reporter
c-Myc	28RH-NCN-1 e #764 Derivato del tioossiazolidinone 10058-F4	Inibizione legame al DNA	29 μ M e 4,6 μ M	Inibizione della proliferazione di una linea cellulare leucemica HL60
HOXA13	Carbossamide lattamica	Inibizione legame al DNA	6,5 μ M	Repressione della trascrizione valutato in vitro mediante sistemi reporter
E2F4	HLM006474	Inibizione legame al DNA	29,8 μ M	Aumento dell'apoptosi; inibizione della proliferazione e dell'invasione di melanociti A375 nello strato dermico
STAT3	Galiellactone (prodotto naturale)	Inibizione legame al DNA	nd	
STAT3	STA-21	Inibizione legame al DNA	nd	
EWS-FLI1	NSC635473 e suo derivato YK-4-279	Riduzione legame a RNA elicasi A (RHA) in vitro	10 μ M	Inibizione della trascrizione in un sistema reporter ed effetto antiproliferativo delle cellule ESFT (<i>Ewing's Sarcoma Family Tumor</i>)

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*; EWS-FLI1: proteina di fusione oncogenica coinvolta nell'insorgenza di sarcoma di Ewing; nd: non determinato

TAKE HOME MESSAGE

- La trascrizione di un gene è un meccanismo finemente regolato in termini di tessuto specificità e nel tempo (differenziamento) e può essere costitutiva o inducibile.
- La formazione di un complesso di pre-inizio stabile, posizionato correttamente sul gene, che consenta alla RNAP II di iniziare la sintesi dell'RNA messaggero, è requisito indispensabile per l'espressione di un gene. Questo evento viene assicurato dall'interazione di fattori di trascrizione e co-fattori generali e specifici con sequenze di DNA che costituiscono gli elementi di regolazione prossimali o distali (enhancer/silencer).
- Gli attivatori e/o repressori regolano la trascrizione reclutando co-attivatori o co-repressori modificatori della cromatina. Attraverso la modificazione post-traduzionale delle proteine istoniche si genera un "histone code" che porta alla formazione di un ambiente favorevole o sfavorevole alla trascrizione.
- Le modificazioni post-traduzionali dei fattori di trascrizione, quali ad esempio fosforilazione, defosforilazione e ubiquitinazione, permettono alla cellula di rispondere in maniera adeguata a stimoli extracellulari e di modificare il trascrittoma e così consentire lo svolgimento di un programma genetico e/o assicurare l'omeostasi cellulare.
- La complessità dei meccanismi che sottendono alla regolazione dell'espressione di un gene offre molte opportunità di intervento farmacologico. La scoperta che alla base di molte patologie vi sia un'alterazione dell'espressione di numerosi geni ha dato un nuovo impulso allo sviluppo di strategie terapeutiche fondate sull'interferenza diretta con i fattori del macchinario trascrizionale, con l'obiettivo di ripristinare una corretta espressione dei geni. Sul piano teorico, tale interferenza può realizzarsi a livello di fattori di trascrizione, modulando la loro interazione con altri componenti del macchinario basale della trascrizione, o a livello di cofattori, spesso coinvolti nelle modificazioni covalenti degli istoni o nello stato di metilazione del DNA.

Bibliografia essenziale

- Battaglia S, Maguire O, Campbell MJ. Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting. *Int J Cancer* 2010;126:2511-9.
- Carrera I, Treisman J. Message in a nucleus: signalling to the transcriptional machinery. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:397-403.
- Hsia EY, Goodson ML, Zou JX et al. Nuclear receptor coregulators as a new paradigm for therapeutic targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:1227-37.
- Juven-Gershon T, Kadonaga JT. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 2010;339:225-9.
- Koehler AN. A complex task? Direct modulation of transcription factors with small molecules. *Curr Opin Chem Biol* 2010;14:331-40.
- Lee LW, Mapp AK. Transcriptional switches: Chemical approaches to gene regulation. *J Biol Chem* 2010;285:11033-8.
- Ooi L, Wood IC. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nat Rev Genet* 2007;8:544-54.
- Perissi V, Jepsen K, Glass C, Rosenfeld MG. Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet* 2010;11:109-23.
- Tsukiyama T. The in vivo functions of ATP-dependent chromatin remodelling factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:422-9.
- Weake VM, Workman JL. Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat Rev Genet* 2010;11:426-37.
- White RJ, Sharrocks AD. Coordinated control of the gene expression machinery. *Trends Genet* 2010;26:214-20.



I recettori intracellulari

Adriana Maggi, Elisabetta Vegeto

Obiettivi formativi

- Acquisire le conoscenze relative alla comprensione della struttura dei recettori intracellulari
- Acquisire le basi teoriche per la comprensione della diversificazione della via di trasduzione del segnale dei recettori intracellulari
- Comprendere i meccanismi molecolari d'azione dei farmaci attivi sui recettori intracellulari

I recettori intracellulari compongono una delle classi più importanti di fattori di trascrizione nel regno animale. Nei mammiferi, i numerosi membri di questa famiglia regolano lo sviluppo embrionale, la crescita e, nell'animale adulto, l'omeostasi metabolica e la riproduzione. La loro attivazione avviene grazie a sostanze chimiche la cui lipofilia ne permette il passaggio attraverso la membrana cellulare. La prima descrizione dei recettori intracellulari è stata fatta da Elwood Jansen che per primo osservò che un ormone steroideo, il (^3H)-17 β -estradiolo, somministrato in vivo veniva rapidamente concentrato nel nucleo delle cellule degli organi bersaglio. La dimostrazione del meccanismo d'azione di questi ormoni è legata soprattutto agli studi di Bert W. O'Malley il quale provò che in seguito alla somministrazione di (^3H)-progesterone e alla sua internalizzazione nucleare nelle cellule di ovidotto di pollo si osservava un aumento della sintesi di mRNA e della produzione di proteine plasmatiche quali l'avidina. Inoltre i suoi studi provarono che il progesterone riconosceva una proteina intracellulare in grado di legarsi saldamente al DNA. Oggi sappiamo che i recettori intracellulari coordinano a livello dell'intero organismo programmi trascrizionali strettamente interconnessi tra loro e volti a regolare importanti funzioni fisiologiche, quali il controllo della crescita, dello sviluppo e della riproduzione, il metabolismo energetico e il sistema immunitario.

La vastità delle funzioni fisiologiche svolte da questa classe di proteine nell'uomo è comunque sottolineata dal fatto che esse costituiscono il bersaglio d'azione di farmaci oggi in uso per combattere patologie che colpiscono diversi apparati come quelli scheletrico, cardiovascolare, immunitario, riproduttivo, nonché malattie metaboliche. Inoltre, il coinvolgimento di questi recettori nei processi

di crescita e differenziamento cellulare li ha resi bersaglio di terapie antitumorali molto innovative ed essenziali per la sopravvivenza.

Caratteristiche strutturali dei recettori intracellulari

Nel genoma umano la famiglia genica a cui appartengono i recettori intracellulari è composta da 49 membri, di cui 24 sono attivati dal legame diretto con sostanze note, quali ormoni o prodotti del metabolismo, i restanti membri sono definiti "orfani" in quanto non si conosce ancora il ligando.

Classificazione dei recettori

L'analisi comparativa della struttura molecolare dei recettori intracellulari nelle diverse specie animali ha permesso di stabilire l'esistenza di 6 sottofamiglie evolutive di cui le prime tre, e solamente alcuni dei loro membri, sono di interesse farmacologico e verranno quindi considerate in questo capitolo (Figura 20.1A). Ogni sottoclasse può comprendere uno o più sottotipi recettoriali in relazione all'esistenza di isoforme codificate da geni diversi. La classe definita dalla nomenclatura ufficiale come NR1 (*Nuclear Receptor 1*) è molto numerosa e comprende i recettori e i relativi sottotipi recettoriali per gli ormoni tiroidei (TR), per l'acido retinoico (RAR), per gli attivatori della proliferazione perossisomale (PPAR), per gli ossisteroli (LXR, *Liver X Receptor*), per gli acidi biliari (FXR, *Farnesoid X Receptor*), per la vitamina D (VDR), per gli steroidi e gli xenobiotici (PXR) e per l'androstano (recetto-

re costitutivo per l'androstano, CAR). Alla seconda classe NR2 appartengono i sottotipi del recettore per l'acido 9-cis retinoico (RXR), definito come NR2B. I recettori per gli ormoni steroidei sono compresi nella classe NR3, formata da recettori e relativi sottotipi per estrogeni (ER), glucocorticoidi (GR), mineralcorticoidi (MR), progesterone (PR) e androgeni (AR). I recettori orfani, che non compaiono nella figura 20.1A, appartengono sia alle tre classi esposte sopra sia alle classi NR4, NR5 e NR6.

Organizzazione molecolare dei domini funzionali

L'organizzazione strutturale è molto conservata fra le tre classi, e consiste di domini di omologia denominati A/B, C, D, E ed F (Figura 20.1B).

Il dominio più altamente conservato fra tutti i membri della famiglia è il dominio centrale C deputato al legame del recettore con il DNA (DBD, *DNA Binding Domain*). Attraverso questo dominio i recettori intracellulari legano in modo altamente selettivo una breve sequenza nucleotidica detta *elemento di risposta all'ormone* (HRE, *Hormone Responsive Element*) presente nel promotore dei geni bersaglio. Il DBD è formato da 66 amminoacidi e contiene diversi residui di cisteina in posizione molto conservata. Studi di diffrazione ai raggi X di cristalli del dominio C associato a uno specifico HRE hanno permesso di dimostrare che questi amminoacidi basici, per mezzo di legami di coordinazione con due molecole di zinco, formano due conformazioni dette "a dita con zinco" (*zinc finger*), che permettono l'inserimento del recettore all'interno del solco maggiore del DNA. La specificità di legame fra il recettore e il DNA è dovuta alla sequenza recettoriale detta *P-box*, presente fra le ultime due cisteine del primo zinc finger, in cui amminoacidi carichi formano ponti a idrogeno con i nucleotidi presenti nell'HRE; infatti, la sostituzione di un unico amminoacido all'interno del P-box ha comportato il cambiamento della selettività di legame di ER dal suo HRE a quello del GR. Il secondo zinc finger contiene la sequenza detta *D-box*, importante per il riconoscimento dei nucleotidi di spaziatura fra i due elementi dell'HRE (Figura 20.1 e box 20.1). Sul DBD avvengono inoltre delle reazioni di modificazione post-traduzionale ed è un dominio importante per la localizzazione nucleare e nelle interazioni del recettore con fattori e co-attivatori della trascrizione.

Il dominio E è detto *Ligand Binding Domain* (LBD), in quanto è responsabile del legame ad alta affinità con il ligando; in questo dominio si riconoscono quattro superfici strutturalmente distinte ma correlate funzionalmente: 1. la tasca di legame con il ligando, o *Ligand Binding Pocket* (LBP), in cui avviene l'interazione fra il recettore e la molecola lipofila; 2. la superficie di dimerizzazione, che permette il legame del LBD con il dominio LBD di una seconda molecola recettoriale; 3. una superficie di legame con coregolatori; 4. una struttura ad α -elica con funzione di attivazione della trascrizione, chiamata AF-2, che viene esposta sulla superficie recettoriale in seguito al legame con il ligando. Infine, i recettori intracellulari possono

interagire con le heat shock proteins o con co-repressori trascrizionali ancora tramite il dominio E. Anche in questo caso, gli studi di diffrazione ai raggi X hanno chiarito la struttura spaziale assunta da questa regione della proteina recettoriale, nella quale si riconoscono 12 α -eliche, numerate da 1 a 12 (H1-H12). H3, H5 e H6 concorrono a delimitare tramite l'esposizione di amminoacidi prevalentemente idrofobici, la cavità idrofobica LBP in cui alloggerà il ligando. I recettori intracellulari possono formare omodimeri, come avviene per i recettori delle classi NR2 e NR3, o eterodimeri con RXR come avviene per i recettori appartenenti a NR1; l'interfaccia di dimerizzazione è anche questa molto conservata fra i recettori intracellulari. Anche il meccanismo di attivazione del dominio funzionale AF-2 è molto simile nella superfamiglia e prevede che, a seguito del legame con il ligando, avvenga una serie di interazioni intramolecolari che causano il riposizionamento di H11 e H10 e l'apertura di H12. L'elevato grado di flessibilità di H12 è dunque un elemento chiave per comprendere come avvenga la regolazione dell'interazione fra i recettori intracellulari e co-attivatori e co-repressori trascrizionali e quindi dell'attività dei recettori.

La regione A/B del recettore è molto importante per la regolazione della trascrizione genica in quanto contiene la funzione AF-1, un dominio di interazione con il macchinario della trascrizione la cui attività non dipende dal ligando; essendo poco conservata all'interno della famiglia recettoriale, si ipotizza che tale regione abbia un ruolo importante nella specificità d'azione di ciascun recettore. Infine, nella molecola recettoriale sono stati identificati altri sottodomini di notevole rilevanza sia per l'attività recettoriale che per la sua regolazione (Figura 20.1).

È importante sottolineare che, mentre l'elevata omologia di sequenza e di conformazione strutturale dei domini DBD e LBD (a parte la LBP vera e propria che presenta una certa variabilità) rende relativamente semplice una classificazione dei recettori intracellulari sulla base strutturale, la funzione fisiologica e le proprietà farmacologiche di questi recettori non possono essere accorpate seguendo la classificazione strutturale descritta sopra; tali caratteristiche verranno trattate separatamente in seguito.

Recettori intracellulari come fattori di trascrizione regolati da ligandi

I recettori intracellulari possono regolare la trascrizione mediante diversi meccanismi che comprendono: la regolazione della trascrizione in senso sia di attivazione che di repressione, in modo ligando-dipendente o in assenza di ligando, tramite il legame diretto del recettore con il DNA oppure mediante l'interferenza funzionale con altri fattori trascrizionali. Non tutti i recettori della famiglia mostrano tutte queste attività e l'effetto trascrizionale di ogni recettore varia a seconda del tipo cellulare.

In assenza di ligando, i recettori nucleari hanno localizzazione e attività differenti: i recettori steroidei sono associati a proteine inibitorie (le proteine da shock termico, HSP) che, pur conferendo al recettore di neosin-

Nomenclatura					
Classe	Sottoclasse	Recettore	Ligando	HRE	Dimeri
NR1	NR1A1	TR α	Ormoni tiroidei	RGGTCA; Pal, DR-4, PI	E
	NR1A2	TR β			
	NR1B1	RAR α	Acido retinoico	AGTTCA; DR-2, DR-5	E
	NR1B2	RAR β			
	NR1B3	RAR γ			
	NR1C1	PPAR α	Acidi grassi, PGJ2	AGGTCA; DR-1	E
	NR1C2	PPAR β			
	NR1C3	PPAR γ			
	NR1F1	ROR α	Colesterolo, colesteril solfato acido retinoico		E
	NR1F2	ROR β			
	NR1F3	ROR γ			
	NR1H3	LXR α	Ossisteroli	RGKTCA; DR-4	E
	NR1H2	LXR β			
	NR1H4	FXR α	Acidi biliari	AGATCA; DR-4, IR-1	E
	NR1H5	FXR β	Lanosterolo		
	NR1I1	VDR	Vitamina D, 1,25-diidrovit.D	RGKTCA; DR-3, PI-9	E
NR1I2	PXR	Xenobiotici	RGKTCA; DR-3	E	
NR1I3	CAR	Xenobiotici, fenobarbital	RGKTCA; DR-4	E	
NR2	NR2B1	RXR α	Acido 9- <i>cis</i> retinoico	AGGTCA; Pal, DR-1	O, E
	NR2B2	RXR β			
	NR2B3	RXR γ			
NR3	NR3A1	ER α	Estrogeni	RGGTCA; Pal	O
	NR3A2	ER β			
	NR3C1	GR	Cortisolo	AGAACA; Pal	O
	NR3C2	MR	Aldosterone	AGAACA; Pal	O
	NR3C3	PR	Progesterone	AGAACA; Pal	O
	NR3C4	AR	Testosterone	AGAACA; Pal	O

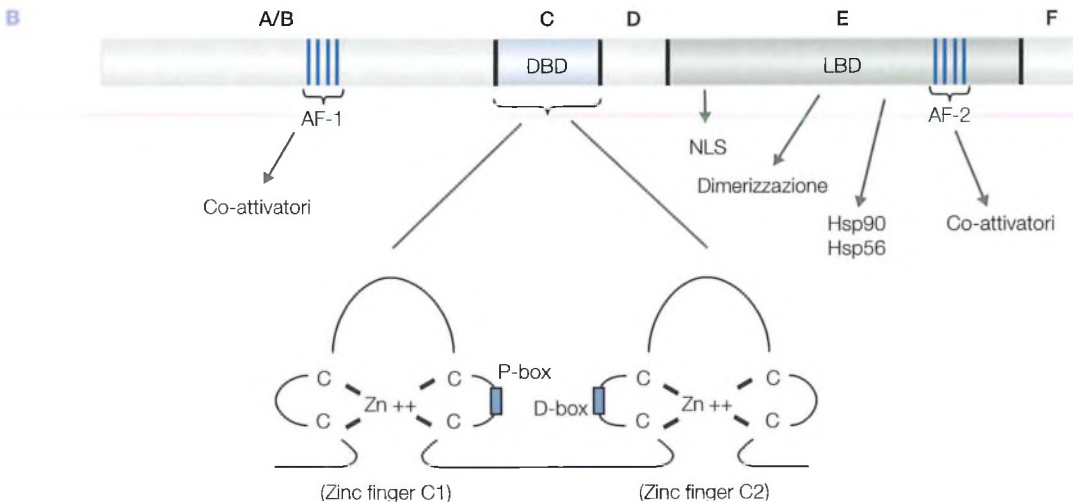
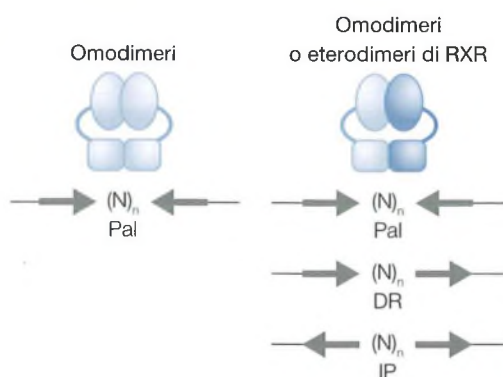


FIGURA 20.1 Classificazione dei recettori intracellulari. **A.** Dall'analisi filogenetica dei geni codificanti per i recettori intracellulari sono state identificate diverse classi e sottofamiglie recettoriali. La tabella riporta la nomenclatura adottata per la classificazione dei recettori nucleari (NR), i ligandi, le sequenze consenso di DNA (HRE, *Hormone Responsive Element*) e il loro orientamento, la modalità di formazione dei dimeri recettoriali, dove O sono omodimeri ed E sono eterodimeri. È stato osservato che i recettori appartenenti a una stessa classe, oltre ad avere una elevata omologia strutturale, mantengono le stesse caratteristiche di legame al DNA e di dimerizzazione, mentre non esiste relazione fra la posizione di un recettore all'interno di una classe e il tipo di ligando riconosciuto. Da questi studi filogenetici è stato proposto un modello di evoluzione in cui i recettori intracellulari ancestrali erano orfani di ligando e interagivano con il DNA in forma di omodimeri. R = A o G; K = G o T; DR: *Direct Repeat*; Pal: palindromo; PI: palindromo inversa (vedi Box 1). **B.** Rappresentazione schematica della struttura dei recettori intracellulari. I recettori sono composti da diversi domini funzionali: la regione A/B, altamente variabile sia nella sequenza che nelle dimensioni, contiene il dominio di attivazione della trascrizione AF-1 (che può funzionare anche in assenza del ligando quando isolato dalla molecola recettoriale, come dimostrato negli studi di farmacologia molecolare) ed è il bersaglio di modificazioni post-traduzionali importanti per l'attività del recettore; la regione C, in cui è presente il dominio di legame con il DNA, o DBD, è descritta nel testo; la regione D, di dimensioni variabili e poco conservata, funge da collegamento fra i domini DBD e LBD e permette l'assunzione di diverse conformazioni senza problemi di ingombro sterico; la regione E permette il legame con il ligando tramite il LBD, la dimerizzazione, l'attivazione della trascrizione mediante esposizione di AF-2 a seguito del legame con il ligando, il segnale di localizzazione nucleare (NLS) e di interazione con le proteine da shock termico (hsp); la regione F non è presente in tutti i recettori intracellulari e la sua funzione è ancora poco conosciuta. Nel particolare del DBD viene schematizzata la conformazione di questo dominio per evidenziare le strutture digitiformi (Zinc finger), formate dal legame di coordinazione fra quattro cisteine (C) e un atomo di zinco, e i box P e D.

BOX 1 Le sequenze di DNA responsive all'ormone



I recettori intracellulari, attivati dal legame con il proprio ligando, possiedono una elevata affinità per sequenze specifiche di DNA, che si trovano nel promotore di alcuni geni (Figura 20.3). Queste sequenze sono denominate "sequenze responsive all'ormone" (HRE, *Hormone Responsive Elements*). Nel caso dei recettori per gli ormoni steroidei, e in genere per tutti i membri della famiglia recettoriale che formano omodimeri, le HRE sono sequenze palindromiche (Pal), ossia sequenze di DNA di 11-15 nucleotidi composte da una ripetizione, intorno a un centro di simmetria, di una stessa sequenza invertita e capovolta, definite anche "inverted repeat" (Figura 20.1A). La sequenza palindromica degli HRE dei recettori steroidei è AGAACA separata da tre nucleotidi, con l'eccezione dell'ER che riconosce la sequenza AGGTC A. I recettori di classe 1 e 2 legano il DNA in forma eterodimerica associandosi a una molecola di recettore RXR. Il complesso asimmetrico generato da tale associazione riconosce brevi sequenze di DNA ripetute in modo diretto (*Direct Repeat*, DR) o inverso (*Inverted Repeat*, IR) e distanziate l'una dall'altra da un diverso numero di nucleotidi, elemento importante per la specificità di legame dei recettori di queste classi, determinata dalla conformazione e dalle dimensioni dell'eterodimero.

tesì una struttura terziaria appropriata, impediscono per ingombro sterico la dimerizzazione e il legame al DNA; al contrario, i recettori RAR, TR, PPAR e LXR in assenza del ligando sono associati al DNA in forma di eterodimeri con RXR e reprimono attivamente la trascrizione dei geni bersaglio, con un meccanismo definito di repressione della trascrizione ligando-indipendente. Questa funzione viene svolta mediante l'associazione con co-repressori trascrizionali, come NCoR e SMRT.

Classificazione dei ligandi

Classi dei ligandi per i recettori intracellulari

I ligandi per i recettori intracellulari possono essere suddivisi in tre diverse classi. La prima è quella degli ormoni steroidei i quali sono sintetizzati da ghiandole endocrine sotto il controllo di fattori secreti dall'ipofisi e soggetti a una regolazione di tipo feed-back. L'affinità per il proprio recettore di tutti gli ormoni steroidei è molto elevata (la costante di dissociazione K_d è generalmente dell'ordine di 0,01-1 nM). Nei vertebrati questi ormoni regolano il differenziamento sessuale, la riproduzione, il metabolismo dei carboidrati e il bilancio elettrolitico e il sistema immunitario.

La seconda è rappresentata dai lipidi di origine alimentare, la cui concentrazione non può essere regolata con meccanismo di feed-back. Questi ligandi si associano con bassa affinità (K_d 1-10 μ M) ai recettori PPAR, LXR, FXR, SXR/PXR e CAR, recettori che controllano l'omeostasi lipidica comportandosi da sensori dello stato lipidico in quanto modulano quattro processi biologici principali dell'omeostasi lipidica, ossia metabolismo, formazione di riserve, trasporto ed eliminazione dei lipidi.

A metà strada fra queste due classi di ligandi sono le molecole che si associano a TR, RAR e VDR in quanto possiedono caratteristiche sia dei ligandi dei recettori endocrini sia di quelli dei sensori lipidici. Infatti questi ligandi derivano principalmente dai lipidi alimentari, come l'acido retinoico, oppure necessitano di elementi essenziali come i raggi ultravioletti per la vitamina D o lo iodio per gli ormoni tiroidei, e regolano programmi trascrizionali, quali morfogenesi o sviluppo, che li avvicinano dal punto di vista funzionale ai ligandi dei recettori steroidei.

L'attivazione trascrizionale ligando-dipendente comporta modifiche della conformazione molecolare e delle interazioni tra proteine

L'entrata del ligando nella cavità lipofila del dominio E determina modificazioni della struttura con scivolamento dell'elica 12 che si posiziona in modo da bloccare la fuoriuscita del ligando. Inoltre, il legame con il ligando causa altre alterazioni che portano al rilascio delle HSP dall'interazione con i recettori steroidei, permettendo loro di dimerizzare e interagire con il DNA (Figura 20.2A). In seguito al rilascio delle HSP i recettori steroidei possono subire modificazioni post-traduzionali, quali fosforilazioni nel dominio AF-1 e acetilazione a livello del DBD. Tali modificazioni sono funzionalmente molto importanti in quanto influenzano la localizzazione intranucleare delle proteine recettoriali e la possibilità di interagire con altre proteine della trascrizione e con il DNA. Per i recettori NR1 la modificazione conformazionale indotta dal legame con agonisti porta alla sostituzione dei co-repressori con co-attivatori trascrizionali. Generalmente questo richiede l'intervento di enzimi che favoriscono l'aggiunta di ubiquitine ai co-repressori che vengono così degradati tramite il proteosoma.

Il sito di legame del recettore sul DNA, detto HRE, è costituito da una breve sequenza di circa 15 nucleotidi specifica per ogni recettore e contenente un motivo di 5-6 nucleotidi che si trova ripetuto in modo diretto, inverso o palindromico a un intervallo di 1-3 nucleotidi di distanza (Figura 20.1A e Box 20.1). Il legame recettore-DNA è necessario per l'inizio di una serie di interazioni con proteine nucleari, inclusi co-regolatori e fattori generali e specifici di trascrizione, che permettono al complesso recettore-ligando di regolare la trascrizione dei geni bersaglio; il legame con i co-attivatori facilita mentre quello con i co-repressori inibisce il legame del complesso di inizio della trascrizione sul promotore del gene bersaglio. I co-attivatori, quali le proteine della famiglia di SRC-1, a loro volta si associano a diversi complessi nucleari che facilitano la trascrizione, fra cui le acetilasi nucleari che tramite l'acetilazione di residui di lisina delle proteine istoniche riducono l'affinità di legame fra queste proteine e il DNA, facilitando così il rilascio degli istoni e l'attività dei fattori di inizio della trascrizione e della RNA polimerasi-II (Figura 20.3A). Similmente, i co-repressori, reclutati dai recettori NR1 in assenza di ligando, o quando i recettori intracellulari sono legati ad antagonisti (vedi oltre), formano dei complessi proteici con attività di deacetilazione degli istoni (Figura 20.3B). Il riconoscimento dei co-attivatori costituisce quindi un fattore fondamentale per l'attività dei recettori in presenza del proprio ligando, o di un farmaco agonista come spiegato più avanti, ed è come detto determinato dal riposizionamento dell'elica H12 e dall'esposizione dei domini di interazione AF-2 e AF-1. È importante sottolineare che la natura del ligando, imponendo l'assunzione di una

conformazione spaziale specifica del recettore, gioca un ruolo fondamentale nelle interazioni proteina-proteina che determinano l'esecuzione di programmi trascrizionali specifici di ciascun complesso recettore-ligando, come provato da numerosi studi recenti nei quali si dimostra che in un determinato tipo cellulare i geni regolati da un recettore specifico sono strettamente legati al tipo di ligando che ne determina l'attivazione.

Numerosi recettori intracellulari reprimono, anziché attivare, l'espressione genica: trans-repressione ligando-dipendente

Studi basati su matrici ad alta densità, o *biochip*, hanno dimostrato che in seguito al legame con il proprio ligando numerosi recettori intracellulari reprimono, oltre a stimolare, l'espressione genica. I meccanismi coinvolti in tale fenomeno di repressione ligando-dipendente sono tutt'oggi oggetto di studio e possono essere molteplici. Una via di repressione ben descritta risulta dal legame del recettore intracellulare con altri fattori di trascrizione quali NF- κ B (una famiglia di fattori di trascrizione che stimola, fra le altre, l'espressione di proteine coinvolte nello scatenamento della risposta infiammatoria) o AP-1 (fattori che regolano la proliferazione cellulare), con conseguente inibizione della loro capacità di stimolare in modo produttivo l'espressione dei propri geni bersaglio. Inoltre i recettori intracellulari possono entrare in competizione con NF- κ B o AP-1 per il legame a co-attivatori o a fattori di trascrizione basali, con conseguente diminuzione della loro disponibilità. È stato ipotizzato che il GR, attivato dal desametasone, porti alla riduzione dell'attività di NF- κ B, impedendo che quest'ultimo attivi i geni nel

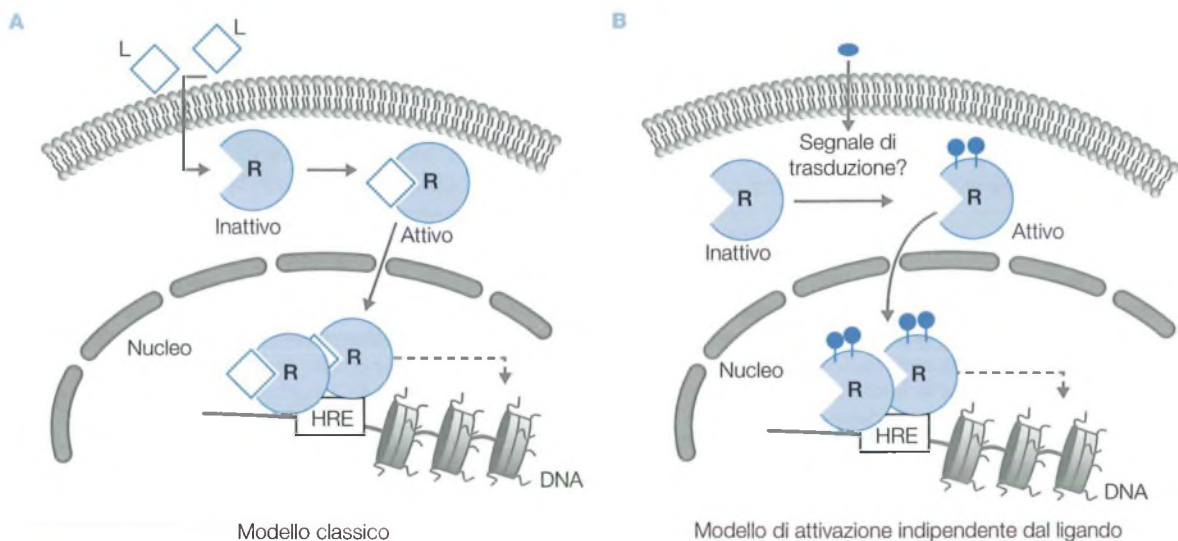


FIGURA 20.2 Meccanismo d'azione dei recettori intracellulari. **A.** Il modello classico di attivazione ligando-dipendente dei recettori intracellulari prevede che, in seguito all'interazione con il ligando (L), il recettore venga rilasciato dal complesso con proteine inibitorie e attivato a interagire con le sequenze regolatorie HRE poste nel promotore dei geni bersaglio e con altre proteine nucleari, regolando quindi la trascrizione di geni specifici. **B.** Il modello di attivazione ligando-indipendente dei recettori intracellulari postula l'attivazione iniziale di proteinchinasi che, fosforilando il recettore (o fattori di trascrizione a esso associato e che in seguito a questa fosforilazione favoriscono il legame recettore-DNA) ne modificano la conformazione strutturale, similmente a quanto avviene in seguito all'interazione con l'ormone; tali fosforilazioni favoriscono la dimerizzazione e il legame ad alta affinità con il DNA.

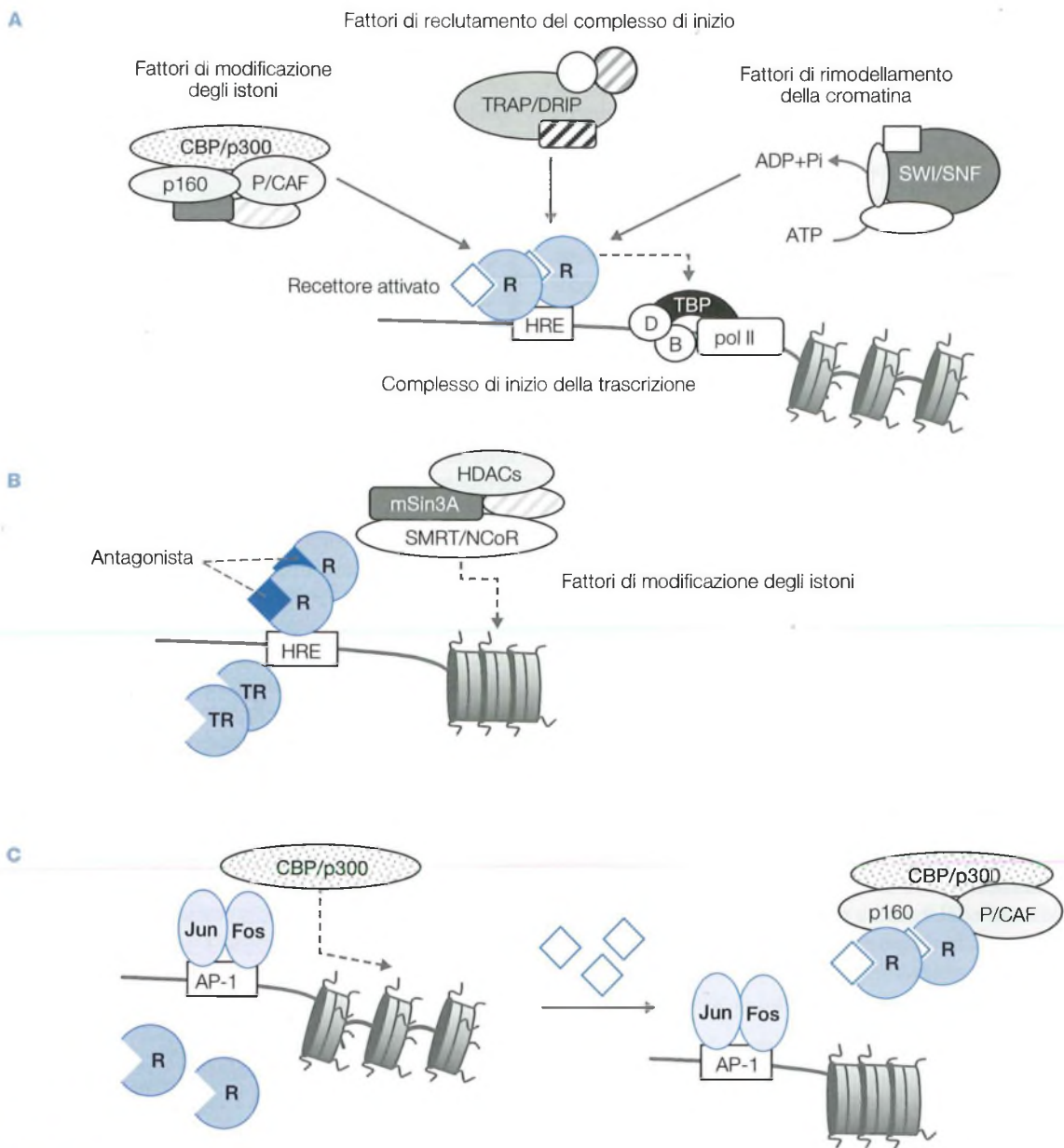


Fig. 20.3 I recettori intracellulari sono dei fattori di trascrizione. **A.** L'attivazione della trascrizione genica indotta dai recettori intracellulari avviene mediante l'interazione del recettore con proteine nucleari che stabilizzano il complesso di inizio della trascrizione (fattori generali di trascrizione, come TBP, e la RNA pol II). Perché questa reazione avvenga efficientemente, il recettore richiama anche altri tipi di proteine nucleari: il complesso dei fattori di modificazione degli istoni, di recente scoperta, costituito da proteine definite co-attivatori dei recettori intracellulari, i più importanti dei quali sono p160 e P/CAF; questi co-attivatori, o altre proteine richiamate da essi, come CBP/p300, contengono l'attività di acetil-trasferasi degli istoni: acetilando le lisine di queste proteine della cromatina facilitano lo svolgimento della doppia elica del DNA e la formazione del template, a singolo filamento, per la sintesi del trascritto primario. Studi di mutagenesi hanno permesso di individuare nel dominio AF-2 il sito di interazione dei recettori intracellulari con questi co-attivatori. Inoltre, i recettori attivati reclutano i fattori di rimodellamento della cromatina, come SWI/SNF, che utilizzando ATP modificano la conformazione del DNA nei nucleosomi; infine, i recettori richiamano i fattori di reclutamento del complesso di inizio, come TRAP/DRIP, che attirano la RNA-polimerasi II sul sito di inizio della trascrizione. La presenza del recettore attivato sul promotore di geni bersaglio stimola la formazione di questi macrocomplessi proteici che sono dei potenti attivatori della trascrizione. **B.** Alcuni recettori, come TR e RAR, in assenza del proprio ligando sono legati all'HRE e reprimono la trascrizione genica. All'arrivo dell'ormone, l'inibizione viene rilasciata e si attiva la trascrizione. Sono state identificate le proteine, chiamate co-repressori, responsabili dell'attività di silenziamento trascrizionale di TR ed RAR privi del ligando, le più importanti delle quali sono SMRT ed NcoR. Questi co-repressori reclutano sul promotore delle proteine deacetilasiche, che deacetilano gli istoni e mantengono la cromatina in uno stato inattivo. È stato dimostrato che questi repressori vengono attirati sul DNA dal recettore legato a molecole antagoniste (ad esempio, il tamoxifene). Di conseguenza, i recettori intracellulari possono agire anche come potenti repressori della trascrizione. **C.** I recettori intracellulari possono attuare un meccanismo di regolazione trascrizionale indipendente dal legame con il DNA; pur non legandosi direttamente a un HRE, i recettori reprimono l'espressione di alcuni geni inibendo l'attività trascrizionale di fattori di trascrizione, quali NF- κ B o AP-1, in quanto sottraggono dei co-attivatori generali di regolazione trascrizionale (ad esempio, la proteina CBP) che non sono più disponibili.

cui promotore è presente un elemento responsivo a NF- κ B e non un GRE, portando quindi a una diminuzione dell'espressione di fattori che scatenano e sostengono l'infiammazione (Figura 20.3C).

Ancora poco definita è la possibilità che i recettori intracellulari interagiscono direttamente con il DNA, su HRE "negativi", per esplicare tali azioni.

L'attivazione trascrizionale dei recettori intracellulari può avvenire anche in assenza di ligando

Oltre ai meccanismi di attivazione recettoriale che si fondano sulla interazione diretta del ligando-recettore, è ormai ben assodato che alcuni membri della superfamiglia recettoriale possono essere attivati anche in assenza del ligando tramite modificazioni post-traduzionali della proteina recettoriale, quali fosforilazione, sumoilazione e acetilazione. Tali modificazioni sono generalmente effettuate da enzimi che costituiscono le vie di trasduzione di recettori di membrana (ad esempio, STAT o MAPK). Stimolati dai propri ligandi, diversi recettori per fattori di crescita attivano chinasi in grado di fosforilare recettori intracellulari specifici causando la dissociazione delle HSP e l'attivazione del recettore di membrana. Questo fenomeno è stato ben descritto per i recettori degli ormoni steroidei (recettore degli estrogeni, del progesterone e degli androgeni) che possono essere messi in azione in seguito all'attivazione di recettori per fattori di crescita epidermici (EGF), insulino-simile (IGF-I) e trasformante (TGF), oppure per neurotrasmettitori quali la dopamina (Figura 20.2B). La prova dell'esistenza di tale meccanismo è stata fornita da studi condotti su modelli animali che permettono di studiare l'attivazione recettoriale in vivo con metodiche di imaging funzionale, mediante le quali si è osservato che recettori quali AR ed ER possano essere attivi trascrizionalmente anche dopo una prolungata deplezione di androgeni ed estrogeni dal circolo. Mentre è ancora in discussione l'esatta sequenza di eventi che determina lo stato di attivazione dei recettori intracellulari non legati a ligando (semplice modificazione post-traduzionale del recettore o catene di modificazioni che coinvolgono anche altre proteine della trascrizione), più chiaro sembra il ruolo di tali meccanismi di interazione crociata che si sarebbero instaurati in cellule eucariote ancestrali, dove i recettori intracellulari fungevano da fattori di trascrizione sensibili ai meccanismi di trasduzione del segnale dei recettori di membrana, con il vantaggio di arricchire enormemente le possibilità di regolazione della trascrizione in ogni cellula, in diversi stati fisiologici, in risposta a stimoli diversi. A supporto di tale ipotesi va ricordata l'esistenza dei recettori "orfani" per i quali sembra non esistano ligandi in grado di mediarne l'attivazione, sebbene agiscano da regolatori dell'omeostasi cellulare modulando direttamente la trascrizione genica (ad esempio, i recettori della famiglia NURR).

Il legame dei recettori intracellulari al DNA ha oscillazioni temporali

La possibilità di ingegnerizzare modelli cellulari con proteine bioluminescenti la cui espressione è strettamente controllata da promotori contenenti HRE ha permesso di studiare nel tempo l'attività genomica dei recettori intracellulari. Questi esperimenti hanno dimostrato che l'associazione dei recettori con il DNA e con le proteine dell'apparato trascrizionale ha un andamento ondulatorio nel tempo che prevede la successione di eventi di assemblaggio e disassemblaggio di tutte le proteine rilevanti per la trascrizione. Le pause di trascrizione sono dovute all'intervento di fenomeni di degradazione, spesso diretti da enzimi che inducono la ubiquitinazione dei recettori attivi e dei loro co-regolatori, assicurando quindi che a uno stimolo trascrizionale consegua una risposta con un termine temporale strettamente dipendente dalla intensità dell'attività trascrizionale indotta. Questo avviene assicurando che a ogni ciclo di trascrizione al recettore venga legato un numero finito di monomeri di ubiquitina che inizialmente non interferiscono con l'attività recettoriale, ma che accumulandosi nel tempo determinano il riconoscimento del recettore da parte del proteosoma e la sua degradazione. Accanto a questo meccanismo è indubbio che altri fattori contribuiscano a rendere discontinua l'attività del recettore sul promotore dei geni bersaglio (ad esempio, è noto che la metilazione facilita il legame tra recettori intracellulari e DNA), al fine di regolare la produzione di proteine bersaglio in relazione non solo allo stimolo ormonale specifico ma anche all'intero metabolismo cellulare.

Attività extra-nucleare dei recettori intracellulari

Già negli anni 70 studi di tipo elettrofisiologico avevano dimostrato che l'estradiolo aumentava la mobilità di calcio intracellulare e che questo evento avveniva dopo millisecondi dall'applicazione dello stimolo, un lasso di tempo troppo rapido per essere mediato da neosintesi proteica. Ulteriori studi hanno dimostrato che tale attività è dovuta alla localizzazione citoplasmatica di ER in alcuni tipi cellulari e all'interazione del recettore con sistemi enzimatici citoplasmatici (Figura 20.4). Questo meccanismo d'azione non genomico concorre nell'attività di altri recettori intracellulari, quali AR, GR, PR.

Attività fisiologiche e controllo farmacologico dei recettori intracellulari

Che cosa determina la somiglianza strutturale fra recettori omologhi?

L'esistenza di un elevato grado di similarità strutturale tra i diversi membri della famiglia dei recettori intracellulari e di condivisione di HRE identici, richiede l'interrogativo su come queste proteine possano agire in modo diverso l'una dall'altra: il progesterone e i glucocorticoidi svolgono ad esempio un ruolo fisiologico molto diverso

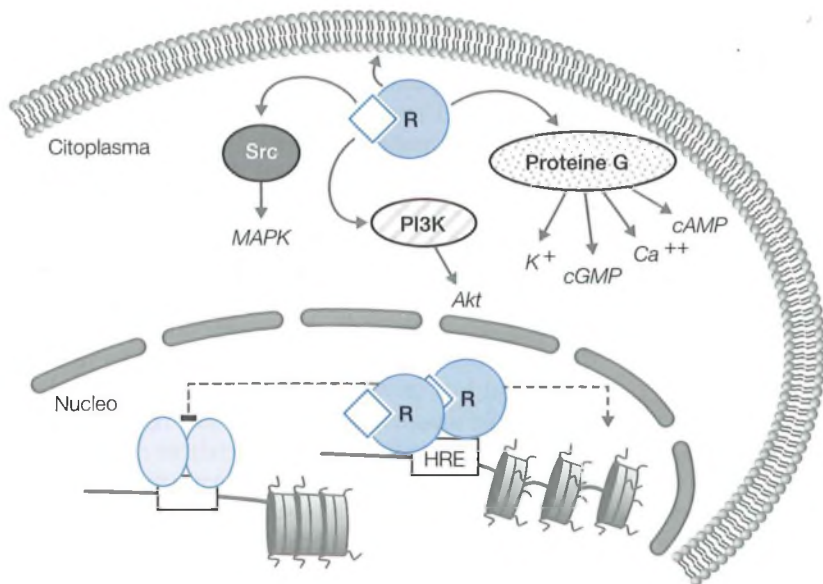


FIGURA 20.4 Attività nucleare e citoplasmatica del recettore degli estrogeni (R). Il recettore agisce sia a livello nucleare, dove regola in senso sia positivo che negativo la trascrizione genica, sia nel citoplasma, dove, in seguito all'attivazione dovuta al legame con l'ormone, interagisce con enzimi e proteine coinvolte in altre vie di trasduzione del segnale, come Src, PI3K e le proteine G, stimolandone l'attività.

pur legandosi a recettori altamente omologhi sia al livello del DBD che dell'LBD e che interagiscono con HRE identico. I principali meccanismi ipotizzati per spiegare la specificità d'azione di recettori altamente omologhi sono tre. Il primo è legato alla diversa espressione delle proteine recettoriali nei tessuti. A riprova di questa affermazione va riportata una evidenza sperimentale ottenuta in epatociti, cellule che esprimono GR e non PR; tali cellule sono state ingegnerizzate sperimentalmente per esprimere il recettore del progesterone in concentrazioni simili a quelle del recettore dei glucocorticoidi e si è potuto osservare che il progesterone induceva la stessa risposta osservata in seguito a stimolazione con glucocorticoidi, provando quindi che, se presente, il PR può essere attivato a legarsi al promotore dei geni bersaglio del GR e modulare la loro espressione al pari del GR stesso. Il secondo meccanismo ipotizza che i due recettori attivino la trascrizione di geni bersaglio distinti in quanto interagiscono con co-regolatori e fattori nucleari specifici, il che porta a una diversificazione delle attività dei recettori in presenza dei propri ligandi in uno stesso tessuto. Infine, una terza ipotesi prevede che il metabolismo degli ormoni, in particolare di quelli steroidei, sia tessuto-specifico e determini la trasformazione in metaboliti dotati di ridotta affinità per il proprio recettore che non viene perciò attivato.

L'attività biologica dei recettori nucleari è tessuto-specifica

Nonostante gli HRE siano elementi genomici uguali in tutte le cellule dell'organismo, i geni regolati da un recettore in un tessuto sono diversi da quelli regolati dallo stesso recettore in un altro organo, nonostante entrambi i tessuti esprimano livelli simili di recettore; ad esempio l'insieme di geni regolati dal complesso 17 β -estradiolo-ER α nell'endometrio sono diversi da quelli modulati da questo stesso complesso nell'osso. Alla determinazione della tessuto-specificità di azione dei recettori intracel-

lulari possono concorrere diversi fattori: ad esempio, durante il differenziamento cellulare alcune porzioni del genoma vengono opportunamente modificate (mediante la metilazione di nucleotidi specifici oppure per interazione con particolari proteine della cromatina) in modo da divenire inaccessibili alle proteine della trascrizione. Tale porzione del genoma, pur contenendo le sequenze di risposta ormonale, non potrà legare i recettori che quindi, in queste cellule, attiveranno risposte diverse rispetto a quando agiscono in cellule in cui tali elementi non sono mascherati. Un altro fattore determinante la tessuto-specificità d'azione dei recettori intracellulari è legato alla loro interazione con proteine di regolazione trascrizionale che sono tessuto-specifiche: l'efficienza di trascrizione di un gene è il risultato di un complesso di interazioni tra diversi regolatori (recettori intracellulari, co-regolatori e altri fattori) e l'apparato trascrizionale, in quanto nel promotore possono essere presenti diversi elementi di regolazione (HRE e altri elementi di risposta, ad esempio, per AP-1 o NF-kB); l'attività dei recettori intracellulari dipende quindi sia dalla disponibilità del ligando sia dalla disponibilità dei co-regolatori e fattori della trascrizione che è diversa nei diversi tipi cellulari, in relazione anche al loro stato di differenziamento. Questo comporta che un recettore potrà formare complessi di regolazione diversi nei tessuti in cui è espresso e quindi regolare in modo diverso, tessuto-specifico, uno stesso gene. Infine, all'interno di una stessa cellula, alcuni geni potrebbero essere maggiormente suscettibili all'azione recettoriale in base alla disposizione e alla molteplicità degli HRE presenti nel promotore. È stato infatti dimostrato che l'affinità dei dimeri recettoriali per elementi di risposta singoli ($K_d = 10^{-8}$ M) viene enormemente potenziata dalla presenza di più elementi in serie (per 2 HRE ravvicinati la K_d è di circa 10^{-11} M). In base a ciò uno stesso promotore potrebbe risentire di variazioni anche minime del numero di recettori che sono presenti in tipi cellulari diversi.

Agonisti e antagonisti recettoriali

Il trattamento farmacologico di disfunzioni in cui siano implicati i recettori intracellulari avviene prevalentemente mediante l'utilizzo di farmaci agonisti o antagonisti dei recettori ampiamente utilizzati in clinica (vedi **CD**: Approfondimento 20.1. *I ligandi dei recettori intracellulari*). Di facile comprensione è il meccanismo d'azione delle molecole ad attività agonista che mimano gli effetti fisiologici dei ligandi endogeni agendo sul recettore con meccanismo d'azione simile e controllando la funzione del dominio AF-2 tramite il riarrangiamento delle α -eliche dell'LBD nella molecola recettoriale.

Farmaci ad azione agonista sui recettori intracellulari vengono frequentemente utilizzati in terapie di sostituzione per sopperire a carenze dei ligandi endogeni di origine alimentare, come succede per alcune vitamine, di origine fisiologica, come avviene per estrogeni e progestinici durante la menopausa, o di origine patologica e genetica, come nel caso della tiroxina nell'ipotiroidismo o della vitamina D nel rachitismo.

Più complesso è il meccanismo di azione degli antagonisti. Pur legandosi in modo competitivo sul dominio LBD recettoriale, la conformazione assunta dal complesso antagonista-recettore è diversa da quella del ligando endogeno: nonostante si verifichino il distacco delle proteine inibitorie, la dimerizzazione recettoriale, le modificazioni post-trascrizionali e il legame all'HRE specifico, il complesso non è in grado di attivare la trascrizione (Figura 20.3B). Gli studi cristallografici effettuati inizialmente su ER legato a un antagonista hanno mostrato che l'elica H12 risulta posizionata in modo diverso rispetto a quando il recettore è legato a un agonista, e si trova in una cavità, insieme a H3 e H5, che maschera AF-2 e preclude il legame ai co-attivatori; come accennato in precedenza nella trattazione dei meccanismi di regolazione della trascrizione, il recettore legato all'antagonista non è inattivo ma recluta co-repressori trascrizionali, come NCoR e SMRT, che inibiscono l'accesso del macchinario di trascrizione (Figura 20.5).

L'utilizzo clinico dei farmaci antagonisti dei recettori intracellulari è diretto principalmente a modificare l'attività della sottoclasse dei recettori per gli ormoni sessuali nelle patologie neoplastiche ormono-responsive; ad esempio il tamoxifene è un farmaco antiestrogenico utilizzato nella terapia ormonale del tumore al seno, mentre la flutamida, antagonista di AR, viene impiegato nel tumore della prostata; inoltre, ricordiamo un antagonista di MR, lo spironolattone, impiegato nello scompenso cardiaco congestizio.

I recettori dei glucocorticoidi e dei mineralcorticoidi

Il cortisolo, il principale glucocorticoide sintetizzato dalla corteccia surrenale, ha un ampio spettro d'azioni nell'organismo: regola il metabolismo del glucosio e delle proteine, la risposta allo stress, alcune funzioni nel sistema nervoso centrale, il metabolismo osseo e la funzionalità del sistema immunitario.

Il più ampio impiego clinico dei farmaci appartenenti

alla classe dei glucocorticoidi è il trattamento delle sindromi allergiche. Gli agonisti dei GR, quali cortisone, prednisone, prednisolone, triamcinolone e desametasone, sono inoltre utilizzati nella terapia dell'infiammazione, dell'asma e delle malattie immunitarie (come l'artrite reumatoide, il lupus e la sclerosi multipla), nella prevenzione del rigetto dopo trapianto di organo in qualità di immunosoppressori, come adiuvanti nella chemioterapia dei linfomi e delle leucemie linfoblastiche e nella terapia sostitutiva dell'insufficienza surrenalica. L'assunzione di questi farmaci è però associata a due problematiche: gli effetti collaterali, come diabete, osteoporosi, disfunzioni della crescita, problemi comportamentali, riscontrati in seguito a terapie croniche specialmente nei bambini, e l'insorgenza di resistenza al farmaco.

Come spiegato in precedenza, l'attivazione del GR da parte del proprio ligando è infatti associata a due meccanismi principali, l'attivazione e la transrepressione genica. Si sta svolgendo un'intensa attività di ricerca per individuare agonisti "dissociati" del GR, o anche detti selettivi (*Selective GR Agonists*, SEGRA), di natura sia steroidea che non steroidea, che favoriscano le interazioni GR/proteine nucleari senza causare il legame del GR con il DNA: si ritiene infatti che l'attivazione trascrizionale indotta da GR comporti effetti dannosi, come dimostrato dal fatto che il legame di GR sul GRE presente nel promotore dei geni codificanti per la glucosio-6-fosfatasi e PEPCK, enzimi coinvolti nella gluconeogenesi, sia alla base degli effetti diabetogenici dei glucocorticoidi, così come l'attivazione di altri geni coinvolti nel metabolismo dei grassi e del muscolo; viceversa, l'inibizione della espressione dei geni che portano all'attivazione linfocitaria e di geni coinvolti nel processo infiammatorio, come le citochine, le chemochine, l'interferone-8 e i fattori di crescita ematopoietici, emerge dal meccanismo di transrepressione ligando-dipendente del GR (Figura 20.3C). A riprova dell'esistenza dei due meccanismi si cita come esempio la generazione di topi transgenici portanti una mutazione negli amminoacidi responsabili della dimerizzazione e del legame al DNA del GR, in cui il processo infiammatorio risulta ancora inibito dagli agonisti di tale recettore. Ancora poco chiare sono le cause dell'insorgenza della resistenza ai corticosteroidi, che si sviluppa probabilmente in seguito all'alterazione della via di segnale del GR, come ad esempio per down-regulation autologa, o disfunzioni dei sistemi proteici con cui GR interagisce, e che riflette la complessità e la diversità degli effetti farmacologici dei glucocorticoidi.

I mineralcorticoidi, il più importante dei quali è l'aldosterone, sono anch'essi sintetizzati nella zona corticale del surrene e, tramite il legame con MR, favoriscono il trasporto attivo di sodio nelle cellule bersaglio aumentando l'espressione del gene che codifica per la pompa Na^+/K^+ . Il principale sito d'azione è l'epitelio del tubulo contorto distale. Gli agonisti sintetici dell'MR, quali il fludrocortisone, vengono utilizzati nell'insufficienza surrenalica cronica e nell'ipoadosteronismo.

In caso di iperfunzionamento delle ghiandole surrenali, e quindi di iperproduzione di corticosteroidi, si utilizzano inibitori degli enzimi che sintetizzano gli ormoni steroi-

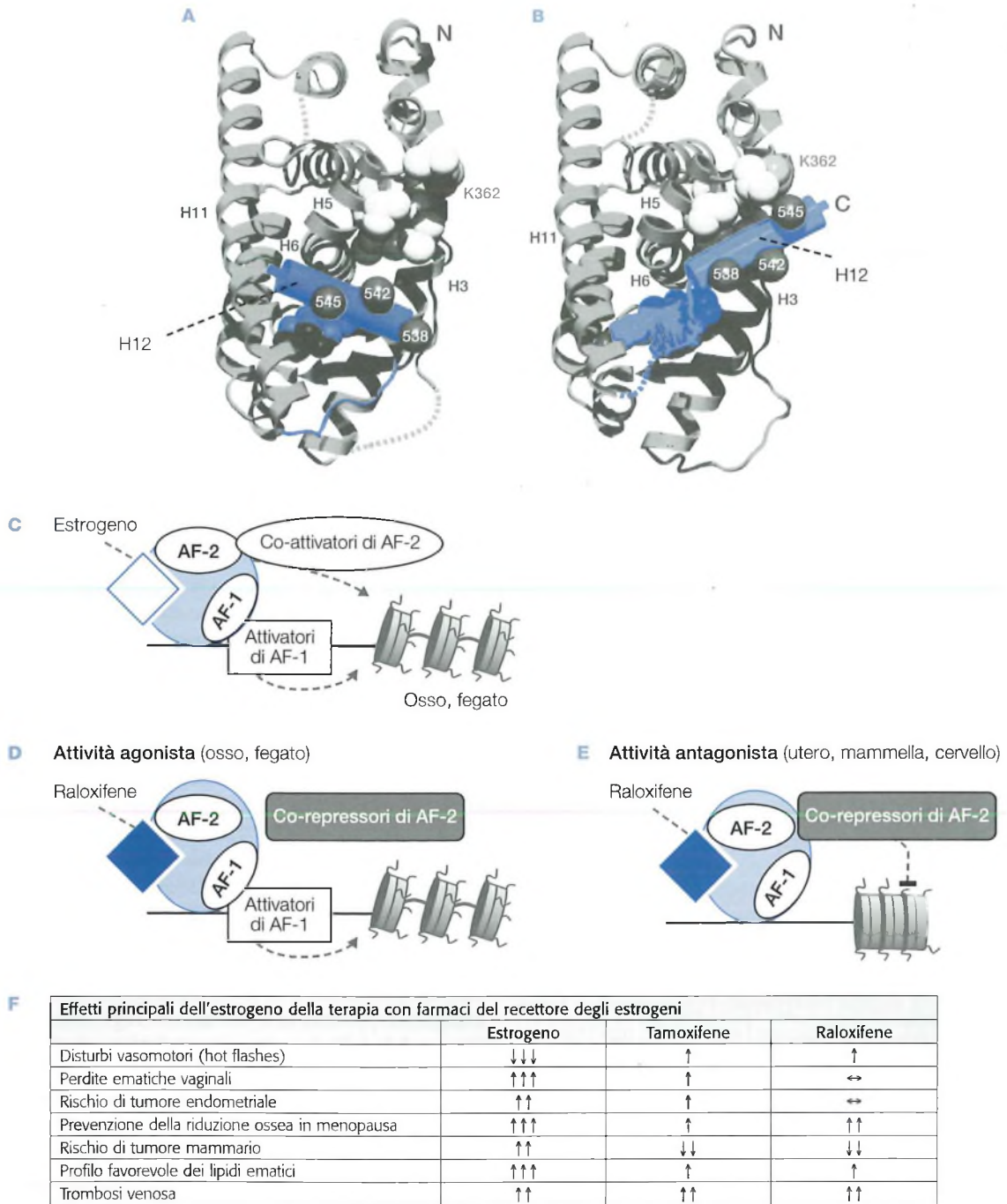


FIGURA 20.5 L'elica H12 e l'attività farmacologica dei ligandi del recettore degli estrogeni. In **A** e in **B** rappresentazioni della struttura terziaria dell'LBD di ER α legato all'estradiolo (E $_2$, **A**) o al raloxifene (**B**). L'elica H12, qui rappresentata come un cilindro, è disposta in posizione diversa quando ER è legato all'agonista (**A**) o al raloxifene (**B**). Sulle α -eliche H3 e H5 e H6 sono evidenziati importanti residui idrofobici e la lisina 362 (K362), necessaria per il reclutamento E2-dipendente di certi co-attivatori. I residui Asp 538, Glu 542 e Asp 545 che formano una superficie carica sull'elica H12 sono posizionati in senso perpendicolare rispetto alla H11. Questa posizione della H12, osservata in tutte le forme di LBD cristallizzate in presenza di un agonista, è un requisito indispensabile per l'attivazione della trascrizione e genera una superficie di interazione, AF-2, competente per l'interazione con i co-attivatori. Il posizionamento della H12 indotto dall'antagonista raloxifene (**B**) coinvolge invece una rotazione della H12 verso la porzione N-terminale dell'LBD, che invece maschera AF-2, portando a esporre superfici di interazione con i co-repressori (Da: Brzozowski et al. Nature 1997;389:753). **C**. Coinvolgimento dei domini AF-1 e AF-2 nell'azione dell'estradiolo. **D**. Attività agonista e (**E**) antagonista del raloxifene nei diversi tessuti; la differente disponibilità di co-regolatori delle funzioni AF-1 e AF-2 è alla base dell'effetto selettivo, tessuto-specifico dei farmaci di ER. **F**. Tabella riassuntiva degli effetti principali ottenuti con la terapia con estradiolo, tamoxifene e raloxifene: la selettività d'azione del raloxifene, che nell'osso e nel fegato si comporta da agonista recettoriale mentre è un antagonista in altri tessuti, quali endometrio e ghiandola mammaria, giustifica l'impiego di questo SERM nella terapia dell'osteoporosi; analogamente, tamoxifene trova impiego nel carcinoma della mammella in qualità di potente antagonista recettoriale, utilizzo che collateralmente si associa a riduzione di osteoporosi.

dei (chetoconazolo, aminoglutetimide). Esistono tuttavia anche degli antagonisti che possono bloccare in modo selettivo l'una o l'altra classe di recettori: lo spironolattone per l'MR e il mifepristone per il GR. Lo spironolattone appartiene alla classe dei diuretici risparmiatori di potassio e, bloccando MR, diminuisce l'espressione della pompa Na^+/K^+ portando a un innalzamento del riassorbimento di Na^+ dal lume tubulare. Il mifepristone è un antagonista del GR ma, a causa dell'alta omologia strutturale tra PR e GR, è un antagonista anche di questo recettore, e infatti viene utilizzato per bloccare l'attività del PR e indurre aborto nel primo trimestre di gravidanza; generalmente tutti i farmaci ad attività antagonista di PR e GR sono dotati di scarsa selettività e bloccano ambedue le classi di recettori.

I recettori degli estrogeni e del progesterone

Gli estrogeni coordinano lo sviluppo e le funzioni degli organi del sistema riproduttivo, favoriscono il mantenimento della massa ossea, regolano svariate funzioni cerebrali fra cui la memoria verbale e l'apprendimento, modificano la produzione epatica di proteine dell'omeostasi lipidica. Il progesterone favorisce il mantenimento della gravidanza e contribuisce alla regolazione dell'attività dei recettori per gli estrogeni.

Il principale uso terapeutico degli agonisti di ER (estradiolo, etinilestradiolo, estrone) e di PR (medrossiprogesterone acetato, desogestrel, norgestimate) è rappresentato dalla combinazione di entrambi gli ormoni nella contraccezione. La loro assunzione continuativa determina il blocco della sintesi di gonadotropine a livello dell'asse ipotalamo-ipofisario; viene inibita così la maturazione dell'ovulo, o ovulazione, mentre rimane inalterato il ciclo mestruale che coinvolge l'endometrio uterino. Agonisti di ER e PR vengono impiegati nella terapia sostitutiva in caso di insufficienza ovarica ma trovano largo impiego soprattutto nella terapia dei sintomi della menopausa. La menopausa, ossia la naturale cessazione della funzionalità ovarica in seguito al depauperamento dei follicoli ovarici, inizia nelle donne verso i 51 anni, può determinare sintomi di lieve o media entità, come disturbi vasomotori e alterazione della funzionalità delle mucose, o fenomeni più gravi, quali osteoporosi e conseguente aumento del rischio di fratture dovute alla riduzione della massa ossea, o alterazione delle funzioni mnemoniche e verbali. La drastica riduzione della produzione di ormoni sessuali femminili è inoltre associata a un aumentato rischio di malattie cardiovascolari. L'assunzione di estrogeni elimina i sintomi vasomotori dovuti alla carenza ormonale e rallenta il processo di riassorbimento del tessuto osseo. Non ancora completamente chiariti sono gli effetti degli estrogeni a livello del sistema cardiovascolare e nervoso. Appare tuttavia chiaro che una terapia prolungata con estrogeni e progestinici in associazione aumenta il rischio di neoplasie agli organi riproduttivi (mammella, ovaio, utero), mentre l'assunzione di estrogeni da soli sembra avere effetti benefici se limitata nel tempo (5 anni) e iniziata all'entrata in menopausa. La eterogeneità di effetti causati dalla riduzione di estrogeni circolanti che comporta modificazioni di organi e sistemi

diversi (come l'osso, il sistema cardiovascolare, il cervello, la pelle, il fegato) è da ascrivere alla ubiquitarità di espressione delle due isoforme di ER ($\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$), che risultano espresse, in quantità diverse, in molti tessuti e tipi cellulari.

I principali antagonisti di questi recettori sono tamoxifene e raloxifene per ER, e danazolo e mifepristone per PR; il principale impiego terapeutico riguarda la terapia del tumore della mammella per gli antagonisti di ER, in quanto tamoxifene blocca l'azione del recettore sulla trascrizione di geni che stimolano la proliferazione delle cellule epiteliali della ghiandola mammaria, e l'interruzione della gravidanza per gli antagonisti del PR (mifepristone).

La farmacologia dei recettori steroidei è complicata dal fatto che il profilo farmacologico di un farmaco cambia a seconda del tessuto (Figura 20.5). Ad esempio, il tamoxifene è un antagonista di ER nelle cellule mammarie e viene utilizzato nella prevenzione della recidiva dei tumori della mammella ER-positivi; lo stesso composto si comporta però da parziale agonista nelle cellule dell'endometrio, causando un lieve aumento del rischio di tumore uterino, e nell'osso dove causa effetti benefici simili agli estrogeni circolanti. Analogamente, il raloxifene è utilizzato nella terapia preventiva dell'osteoporosi quale agonista di ER mentre è un antagonista recettoriale nell'endometrio, caratteristica vantaggiosa di questo farmaco che comporta un diminuito rischio di fenomeni neoplastici uterini. L'uso di raloxifene e tamoxifene si associa peraltro a disturbi vasomotori (vampate di calore), effetto vascolare opposto a quello degli estrogeni.

La differente azione farmacologica di uno stesso ligando nei diversi tessuti si spiega con la seguente ipotesi: in cellule contenenti un numero molto limitato di co-attivatori in grado di legare AF-1, i ligandi antagonisti si comportano come antagonisti puri in quanto bloccano, come detto, la porzione AF-2 in una conformazione non idonea a interagire con l'apparato trascrizionale, mentre permettono il reclutamento di co-repressori; viceversa, in cellule dotate di co-attivatori in grado di riconoscere il dominio AF-1 queste stesse molecole potranno causare un effetto di agonista parziale o agonista puro (Figura 20.5). La ricerca sperimentale sta provvedendo a individuare dei farmaci ad azione selettiva, "tagliata a misura" per ogni tessuto. Questi farmaci sono infatti chiamati SERM: modulatori selettivi di ER. Attualmente, tre SERM di prima generazione sono approvati per l'uso clinico: il tamoxifene e il raloxifene, di cui si è già parlato, e il toremifene, per il trattamento del tumore della mammella in fase avanzata.

Il recettore degli androgeni

Gli androgeni agiscono principalmente sul sistema riproduttivo maschile ma esercitano anche importanti effetti anabolizzanti e sono coinvolti nella proliferazione, nel differenziamento, nell'apoptosi e nel metabolismo di diversi tipi cellulari. AR è localizzato principalmente nel citoplasma; il legame con gli ormoni androgeni, testosterone e diidrotestosterone (DHT), causa quella serie di reazioni descritte in precedenza per gli altri recettori intracellulari.

Sono stati identificati anche meccanismi di attivazione ligando-indipendenti e diverse attività non genomiche. Agonisti del recettore degli androgeni (metiltestosterone, oxandrolone, stanazololo, fluossimesterone) sono utilizzati come terapia sostitutiva di insufficienze testicolari e nell'ipogonadismo ipogonadotropico.

Flutamide e ciproterone acetato sono antagonisti di AR che trovano vasto impiego nella chemioterapia del tumore alla prostata, dove si ipotizza che questi farmaci blocchino l'azione proliferativa di AR.

Nella regione N-terminale di AR è presente una ripetizione dell'amminoacido glutamina (tratto poli-Q) dovuta alla presenza di triplette CAG sul DNA recettoriale; il polimorfismo del tratto poli-Q si associa a una ridotta espressione o attività di AR e l'espansione della tripletta CAG oltre un certo numero di ripetizioni è responsabile di patologie degenerative neuromuscolari.

Il recettore degli ormoni tiroidei

Gli ormoni tiroidei sono sintetizzati nella tiroide a partire dallo iodio e dalla tireoglobulina. Mediante l'interazione con il recettore TR, questi ormoni determinano una regolazione complessa del metabolismo glucidico, lipidico e proteico; sono inoltre indispensabili per un corretto sviluppo somatico, sessuale e del sistema nervoso ed esercitano un controllo sul comportamento e sull'equilibrio psichico. In caso di ipotiroidismo la somministrazione dell'ormone fisiologico, la tiroxina, rappresenta la terapia di elezione. Esistono comunque degli agonisti sintetici, quali la triiodotironina, che vengono somministrati solo in terapie di emergenza (coma da mixedema). Per quanto riguarda il trattamento dell'ipertiroidismo non esistono antagonisti specifici per i recettori degli ormoni tiroidei e generalmente vengono utilizzati farmaci che bloccano la sintesi degli ormoni endogeni a livello tiroideo.

Il recettore della vitamina D

La vitamina D (ergocalciferolo, o vitamina D₂, e colecalciferolo, o vitamina D₃) sintetizzata nella pelle o assorbita dalla dieta, è in realtà un pro-ormone che gioca un ruolo fondamentale sul metabolismo minerale. Aumenta infatti l'efficienza di assorbimento intestinale di calcio e fosfato e favorisce la calcificazione dell'osso. Ergocalciferolo e colecalciferolo, insieme al calcio, vengono utilizzati nelle patologie associate a ipocalcemia e al rachitismo o all'osteomalacia (inadeguata mineralizzazione, rispettivamente, durante lo sviluppo o nell'adulto), e che sono determinate da bassi livelli ematici di vitamina D o da resistenza alla sua azione. Mutazioni della sequenza del gene codificante per il recettore VDR sono state identificate nei pazienti affetti da rachitismo: le mutazioni a carico del DBD causano la totale mancanza di responsabilità del recettore alla vitamina D, in quanto comportano la formazione di segnali di stop per la traduzione del recettore o il legame incontrollato del recettore al DNA; viceversa, i pazienti portatori di mutazioni missenso nell'LBD, che causano una ridotta affinità del recettore per il ligando, rispondono alla terapia con alte dosi di calcitriolo.

Non si conoscono antagonisti specifici del recettore VDR.

Il recettore dell'acido retinoico

La farmacologia del recettore dell'acido retinoico (RAR) e del recettore orfano con il quale questo può dimerizzare (RXR) è stata stimolata dal clonaggio dei due tipi recettoriali ed è in fase molto preliminare. La vitamina A e i suoi analoghi naturali o sintetici sono chiamati retinoidi. L'attività dei recettori RAR è coinvolta nel differenziamento cellulare. L'uso terapeutico della vitamina A e dei retinoidi comprende il trattamento dell'acne (isotretinoina) e della psoriasi (etretinato) e della leucemia mieloide acuta, in cui è associato a una remissione totale della malattia in un numero molto elevato di pazienti.

Il recettore degli attivatori della proliferazione perossisomiale

A differenza degli altri membri della superfamiglia recettoriale, i tre sottotipi recettoriali PPAR α , β e γ possiedono una tasca di legame al ligando relativamente larga che può alloggiare una larga varietà di lipidi endogeni, fra cui gli acidi grassi e i loro derivati metabolici, come gli eicosanoidi; inoltre, ligandi sintetici di diversa natura sono agonisti dei PPAR di notevole importanza clinica. Questi ligandi devono essere presenti in concentrazioni elevate (micromolari) per attivare i PPAR e spesso non solo selettivi per le singole isoforme, lasciando ancora aperta la domanda se rappresentino effettivamente i ligandi fisiologici. In ogni caso, l'attivazione dei PPAR è modulata dalla dieta, dallo stato nutrizionale e metabolico, ed è coinvolta nel controllo di programmi metabolici che governano l'omeostasi energetica tramite il catabolismo degli acidi grassi o l'immagazzinamento dei lipidi. Hanno una distribuzione tissutale simile sebbene ognuno di essi controlli funzioni specifiche nell'omeostasi lipidica. PPAR α è espresso nei tessuti metabolicamente attivi e in particolare nel fegato, dove la sua funzione principale è quella di promuovere il catabolismo degli acidi grassi, stimolare la gluconeogenesi e la sintesi di corpi chetonici. I geni bersaglio di PPAR α sono coinvolti nel coordinamento delle reazioni metaboliche necessarie per conservare l'energia, come la *Fatty-Acid Binding Protein* (FABP), una proteina che lega gli acidi grassi intracellulari, oppure i trasportatori della famiglia ABC, che trasportano gli acidi grassi nei perossisomi dove avviene la β -ossidazione, o gli enzimi epatici CYP4A, che catalizzano la ω -ossidazione. È noto che i fibrati sono degli agonisti di PPAR α che, tramite l'attivazione del catabolismo lipidico, abbassano i livelli plasmatici di trigliceridi. Infatti, i fibrati vengono utilizzati come agenti ipolipidemizzanti nel trattamento delle dislipidemie (ipertrigliceridemie); farmaci come il clofibrato o il gemfibrozil sono utilizzati da decenni per la loro azione di diminuzione dei livelli di trigliceridi e di LDL e di aumento delle HDL, con una conseguente riduzione degli eventi cardiovascolari in soggetti con dislipidemie. PPAR γ è principalmente coinvolto nella regolazione del tessuto adiposo, sia bianco che bruno, poiché promuove l'immagazzinamento di grasso stimolando il differenziamento degli adipociti e aumentando l'espressione di proteine della lipogenesi. Infatti, l'espressione ectopica di PPAR γ in cellule non adipocitarie, ottenuta speri-

mentalmente in vitro, le converte in adipociti, mentre l'eliminazione di questo recettore in fibroblasti allo stadio embrionale abolisce la loro conversione in adipociti. PPAR- γ è il recettore dei farmaci tiazolidin-dioni (TZD), quali il rosiglitazone e il pioglitazone, indicati nella cura del diabete di tipo II (insulino-indipendente) sia in monoterapia che in combinazione con sulfanilurea, metformina, o insulina quando la dieta, l'attività fisica e un solo farmaco non riescono a ridurre i valori glicemici. Aumentando l'utilizzo di glucosio nel muscolo e inibendo la gluconeogenesi epatica, questi farmaci migliorano l'azione dell'insulina nel muscolo scheletrico e nel fegato e abbassano la glicemia.

L'attivazione di PPAR- γ da parte dei TZD induce l'espressione di una serie di geni responsabili del trasporto degli acidi grassi e del loro immagazzinamento e della *de novo* adipogenesi. L'aumento della capacità di captare e conservare i lipidi da parte del tessuto adiposo comporta una redistribuzione dei grassi di origine muscolare ed epatica verso gli adipociti, riducendo così gli effetti negativi che i lipidi hanno sulla via di segnale dell'insulina nel muscolo e nel fegato. Nell'uomo tale espansione dell'adiposità avviene nel tessuto adiposo sottocutaneo e non nei depositi viscerali. Inoltre, l'attivazione di PPAR- γ nel tessuto adiposo riduce la sintesi di adiponectina, resistina e TNF α che, alterando la via di segnale dell'insulina, riducono la sensibilità del muscolo scheletrico e del fegato a questo ormone. Infine, i TZD esercitano degli effetti benefici su parametri cardiovascolari, come il profilo lipidico, la pressione arteriosa, i biomarker flogistici, la funzione endoteliale e lo stato fibrinolitico.

Sfortunatamente, l'utilizzo dei TZD si associa ad aumento di peso secondario all'aumento di adiposità e all'edema, che è una probabile conseguenza dell'attivazione di PPAR γ presente nel rene a livello del dotto collettore, dove induce l'assorbimento di sodio con conseguente ritenzione idrica. Poiché i pazienti diabetici hanno un rischio aumentato per patologie cardiovascolari e molti hanno delle cardiopatie preesistenti, l'edema che a volte si accompagna all'uso di TZDs deve essere monitorato con cura durante la somministrazione di TZD in quanto potrebbe essere un segno di insufficienza cardiaca congestizia. È quindi consigliato iniziare la terapia a basse dosi (ad esempio, rosiglitazone 2 mg/die, pioglitazone 15 mg/die) nei pazienti diabetici con cardiopatia sintomatica lieve, mentre è sconsigliata nei pazienti con scompenso cardiaco marcato.

A differenza delle altre due isoforme, si conosce ancora poco della via di attivazione e dell'importanza fisiologica di PPAR β . Questo recettore è espresso in molti tessuti ed è anch'esso un regolatore del catabolismo degli acidi grassi e dell'omeostasi energetica.

Attualmente la ricerca di base si sta concentrando sullo sviluppo di due nuove classi di ligandi:

1. modulatori di PPAR γ tessuto-selettivi che inducano attivazione recettoriale in certi tessuti, come quello adiposo, e siano inattivi in altri, come il rene; come detto in precedenza, la disponibilità di cofattori tra-

scrizionali cambia nei diversi tessuti ed è auspicabile individuare dei composti che stimolino l'interazione con quelli presenti nel tessuto adiposo e non nel rene;

2. ligandi dualistici, o "dual agonists", che attivino sia PPAR γ che PPAR α , e che quindi possano apportare benefici attraverso il simultaneo trattamento dell'iper-glicemia e della dislipidemia, eventi concomitanti nella patologia diabetica.

Il recettore LXR

I recettori LXR agiscono come sensori del colesterolo che rispondono a concentrazioni elevate di ossisteroli naturali attivando, mediante meccanismo di transattivazione trascrizionale, gruppi di geni che governano il trasporto (ad esempio, la famiglia dei trasportatori del colesterolo ABCA), il catabolismo (quali la 7 α -idrossilasi CYP7A1) e l'eliminazione del colesterolo e il metabolismo degli acidi grassi. LXR β è espresso ubiquitariamente, mentre LXR α è presente nei tessuti in cui avviene il metabolismo lipidico, come fegato, tessuto adiposo, rene, intestino, polmone, ghiandole adrenergiche e macrofagi.

Il recettore FXR

I ligandi biologici di FXR sono alcuni acidi biliari, come l'acido chenodesossicolico, l'acido colico e i rispettivi metaboliti coniugati. L'espressione di FXR è elevata nel sistema enteroepatico, dove agisce da sensore degli acidi biliari per proteggere l'organismo da concentrazioni troppo elevate di queste sostanze. Tale effetto si esplica tramite l'induzione della trascrizione di trasportatori per l'efflusso e la secrezione nella bile degli acidi biliari o per la traslocazione nella circolazione portale, e nell'aumento dell'espressione della proteina SHP (*Small Heterodimer Partner*), un fattore nucleare che reprime la trascrizione di enzimi per la sintesi di acidi biliari.

I recettori CAR e SXR

La detossificazione e l'eliminazione di sostanze chimiche esogene (xenobiotici) e di lipidi vengono regolate da CAR e SXR. Il recettore CAR, chiamato così perché inizialmente veniva ritenuto attivo costituzionalmente, media la risposta a sostanze che possiedono una struttura simile al fenobarbital; è espresso nel fegato, dove lega e attiva il promotore CYP2B in seguito ad attivazione mediata da molecole a struttura simile al fenobarbital, pesticidi benzenici, alcuni androgeni e al miorilassante zoxazolamina.

Il recettore SXR e il suo ortologo nei roditori PXR (*Pregnane X Receptor*) sono più importanti dal punto di vista della farmacocinetica; rispondono a numerosi farmaci e inoltre a contaminanti ambientali, steroidi e acidi biliari tossici. Questi recettori sono principalmente espressi nel fegato e nell'intestino tenue dove inducono l'espressione di CYP3A, l'enzima responsabile del metabolismo di più del 60% dei farmaci, di trasportatori come MDR2, sistema coinvolto nel fenomeno della resistenza ai farmaci.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I recettori intracellulari sono fattori di trascrizione la cui attività può essere regolata da ligandi.
- ▶ Governano diverse reazioni biologiche coinvolte nella regolazione della riproduzione, della crescita e dello sviluppo, del metabolismo energetico e del sistema immunitario.
- ▶ Diverse sottoclassi di recettori intracellulari coordinano nei diversi organi bersaglio programmi trascrizionali con molte interconnessioni tra di loro.
- ▶ Le funzioni fisiologiche svolte da questa classe di proteine nell'uomo sono il bersaglio d'azione di numerosi farmaci impiegati per combattere svariate patologie.

Bibliografia essenziale

- ▶ Bookout AL, Jeong Y, Downes M et al. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 2006;126:789-99.
- ▶ Deblois G, Giguère V. Nuclear receptor location analyses in mammalian genomes: from gene regulation to regulatory networks. *Mol Endocrinol* 2008;22:1999-2011.
- ▶ Han SJ, Lonard DM, O'Malley BW. Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:8-15. Epub 2008 Nov 18.
- ▶ Heldring N, Pike A, Andersson S et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007;87:905-31.
- ▶ IUPHAR Compendium on the pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily. *Pharmacol Rev* 2006;58:684-6.
- ▶ Maggi A, Ciana P, Belcredito S, Vegeto E. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annu Rev Physiol* 2004;66:291-313.
- ▶ York B, O'Malley BW. Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology. *J Biol Chem* 2010;285:38743-50. Epub 2010 Oct 18.

Farmacologia degli RNA

Valerio Fulci, Giuseppe Macino

Obiettivi formativi

- ▶ Conoscere il meccanismo di funzionamento dei siRNA
- ▶ Acquisire i principi per il disegno razionale di siRNA a scopo terapeutico
- ▶ Conoscere le principali modifiche chimiche apportate ad acidi nucleici allo scopo di migliorarne le proprietà farmacologiche
- ▶ Apprendere i metodi per la veicolazione di oligonucleotidi in vivo
- ▶ Conoscere la definizione di aptameri e il loro utilizzo
- ▶ Apprendere come modificare il pattern di splicing utilizzando oligonucleotidi e potenzialità applicative

Nei libri di testo universitari dedicati alla biologia sono spesso riportati, a titolo esemplificativo per gli studenti, i meccanismi d'azione di farmaci capaci di inibire specifici processi cellulari. Nella maggior parte dei casi si tratta di piccole molecole che esercitano la loro funzione legandosi in modo specifico a enzimi cellulari. Questo tipo di piccole molecole sono bene esemplificate da molti antibiotici, da inibitori di diverse classi di chinasi utilizzate in terapie antitumorali fino ai più recenti farmaci capaci di modulare l'attività di enzimi di modificazione degli istoni. Queste molecole agiscono tutte sull'attività di specifiche proteine, in corrispondenza dell'ultimo passaggio di quel flusso di informazione che procede dal DNA e attraverso l'RNA sfocia nella sintesi di proteine, che fungono da componenti strutturali della cellula e sono direttamente responsabili della catalisi delle reazioni biochimiche necessarie per la cellula. Tuttavia, negli ultimi decenni le conoscenze nel campo della Biologia Molecolare sono cresciute in modo esponenziale, permettendo la comprensione dettagliata dei meccanismi di veicolazione dell'informazione genetica all'interno della cellula. Questi importanti avanzamenti hanno permesso, negli ultimi anni, di valutare la possibilità di agire a livello terapeutico non solo sulle proteine, effettori finali del fenotipo cellulare, ma anche sugli acidi nucleici, i depositari della informazione genetica.

Alcuni approcci, che sono collettivamente raggruppati con la denominazione di "terapia genica", mirano alla introduzione di geni in maniera duratura ed ereditabile all'interno del patrimonio genetico di cellule somatiche

del paziente. In genere questo tipo di intervento è finalizzato alla introduzione di una copia funzionale di un gene per compensare una perdita di funzionalità dovuta a una mutazione (vedi Capitolo 18). A fianco della terapia genica stanno tuttavia emergendo altre tecniche quali l'uso di piccole molecole di DNA ed RNA (oligonucleotidi) che permettono di interferire con la fisiologia cellulare senza alterarne permanentemente il patrimonio genetico e che saranno oggetto del presente capitolo.

Strategie per l'uso dell'RNA come farmaco

L'utilizzo di oligonucleotidi a DNA e ancor più a RNA come possibili farmaci vede la sua consacrazione con la scoperta del fenomeno noto come silenziamento genico. Negli ultimi venti anni i ricercatori hanno dimostrato, prima in funghi e piante e successivamente anche nei metazoi, l'esistenza di meccanismi cellulari che consentono a piccole molecole di RNA di interferire (da cui la definizione di interferenza a RNA) con l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Il meccanismo, in estrema sintesi, consente a piccole molecole di RNA a singolo filamento (lunghe 20-24 nucleotidi) di riconoscere per complementarità e con elevata specificità molecole di RNA messaggeri (mRNA) e di indurne la degradazione nel citoplasma. Tali piccole molecole di RNA sono state battezzate *small interfering RNA* (siRNA).

Nonostante l'uso di siRNA sia diventato recentemente estremamente popolare nella ricerca biomolecolare in vitro, esistono altre applicazioni rilevanti nelle quali piccole molecole di RNA possono essere utilizzate a fini terapeutici. Sono particolarmente promettenti approcci nei quali oligonucleotidi antisense sono sfruttati per modificare il pattern di splicing di mRNA all'interno della cellula. Queste strategie trovano applicazione nella correzione di difetti genetici dovuti a mutazioni che vanno a colpire sequenze consensus che marcano i confini introne/esone. Tuttavia, anche nel caso di mutazioni genetiche che determinano la produzione di proteine tronche e non funzionali, è possibile ricorrere ad approcci di questo genere per far produrre alla cellula una proteina che pur non essendo identica alla sua versione wild type, mantiene una attività sufficiente a limitare i sintomi associati alla sua completa assenza. In particolare in questo ultimo caso, la strategia applicata è quella dell'exon skipping. Con questo termine si indica una manipolazione che determina l'esclusione dall'mRNA maturo dell'esone colpito dalla mutazione. La proteina risultante mancherà naturalmente di una porzione e, tuttavia, in alcuni casi, riterrà una funzionalità sufficiente a revertire il fenotipo patologico. Un approccio di questo tipo è stato sperimentato con successo per la cura della distrofia muscolare di Duchenne in un modello murino di questa patologia.

Un'ulteriore applicazione dell'RNA in campo farmacologico è costituita dall'uso di aptameri. In questo caso l'effetto terapeutico della molecola di RNA non è dovuto a interazioni sequenza-specifiche quanto piuttosto alla struttura tridimensionale della molecola. In pratica questo approccio non fa che sfruttare l'eccezionale plasticità

della molecola di RNA per selezionare oligonucleotidi che nella loro struttura terziaria in condizioni fisiologiche possano, in modo simile a quanto fanno altri farmaci più tradizionali, legare con alta specificità e affinità particolari proteine determinando una inibizione della loro attività. Nel box 21.1 vengono elencate le definizioni dei termini più usati in questo ambito.

RNA interference

Differenze e somiglianze tra miRNA e siRNA

Il macchinario molecolare che media l'RNA interference all'interno della cellula eucariote va sotto il nome di RISC (*RNA Induced Silencing Complex*, complesso di silenziamento indotto dall'RNA) e il suo cuore catalitico è rappresentato dalle proteine della famiglia Argonata, conservate in tutti gli eucarioti. In cellule umane la proteina Argonata2 (Ago2) si associa con piccole molecole di RNA endogene (endo-siRNA) o artificiali (siRNA) e utilizza tali piccoli RNA come "sonde" molecolari per individuare molecole di mRNA cellulari a esse perfettamente complementari, determinandone la degradazione per taglio endonucleolitico.

Il meccanismo illustrato offre una grande specificità ed efficienza. Infatti, in un genoma come quello umano, che consta di circa 3 miliardi di basi, la probabilità di trovare più di una volta una sequenza lunga 20 nucleotidi è trascurabile (sono possibili 1.099.511.627.776 possibili diverse combinazioni di 20 nucleotidi consecutivi usando un codice a 4 lettere).

BOX 1 Glossario minimo

- ▶ **siRNA (small interfering RNA)** Piccole molecole sintetiche di RNA lunghe circa 22 nucleotidi e con sequenza perfettamente complementare a quella di una porzione di un mRNA. La loro introduzione all'interno di cellule animali determina la rapida ed efficiente degradazione per taglio endonucleolitico di molecole di mRNA complementari al siRNA in maniera altamente specifica.
- ▶ **Argonata** Le proteine della famiglia Argonata sono conservate dai funghi fino agli animali. Sono coinvolte nei processi di silenziamento genico. Nell'uomo esistono quattro proteine Argonata (AGO1-4). Sono tutte coinvolte nel mediare la regolazione dell'espressione genica da parte degli miRNA. AGO2 è inoltre in grado di effettuare taglio endonucleolitico di RNA messaggeri complementari a specifici siRNA inducendone la degradazione.
- ▶ **microRNA (miRNA)** Piccole molecole di RNA endogene che, attraverso l'azione delle proteine Argonata, regolano a livello post-trascrizionale l'espressione genica.
- ▶ **PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing)** Silenziamento genico post-trascrizionale: con questa espressione si fa riferimento a tutti quei meccanismi che regolano negativamente l'espressione di un particolare gene non inibendone la trascrizione ma, a livello appunto post-trascrizionale, inducendo la degradazione dell'mRNA o inibendone la traduzione.
- ▶ **RISC (RNA Induced Silencing Complex)** Il complesso RISC è un complesso ribonucleoproteico i cui componenti principali sono una piccola (18-24 nt) molecola di RNA e una proteina della famiglia Argonata (AGO1-4 in Homo sapiens). L'RNA è usato come sonda molecolare per il riconoscimento di molecole di mRNA parzialmente o perfettamente complementari. Nel caso di un appaiamento imperfetto il complesso inibisce la traduzione dell'mRNA. Viceversa, nel caso di una perfetta complementarità, AGO2 può effettuare un taglio endonucleolitico che porta alla completa degradazione della molecola di mRNA riconosciuta. La stragrande maggioranza dei complessi RISC in cellule di mammifero contengono, come molecola di RNA, un miRNA.

Tuttavia, a fianco dei siRNA, Ago2 e gli altri membri della stessa famiglia (le proteine Ago1, Ago3, e Ago4) legano anche altre classi di piccoli RNA, tra i quali i più noti e abbondanti sono i microRNA (miRNA), codificati dal genoma umano stesso. A differenza dei siRNA, che funzionano per perfetta complementarità con l'RNA bersaglio determinandone la degradazione, i miRNA guidano l'interazione con gli mRNA bersaglio tramite appaiamento tra una breve porzione del miRNA stesso (chiamata "seed") e porzioni complementari all'interno della regione 3' non tradotta dell'mRNA.

A differenza dei siRNA, i miRNA nei metazoi non inducono l'immediato taglio endonucleolitico e la degradazione dell'RNA bersaglio, ma piuttosto ne inibiscono la traduzione e in alcuni casi ne diminuiscono la stabilità. La visione corrente è che i miRNA agiscano come modulatori fini dell'espressione genica piuttosto che come veri e propri interruttori capaci di accendere o spegnere l'espressione di geni bersaglio.

La possibilità che un siRNA artificiale possa essere usato dalla cellula alla stregua di un miRNA (e quindi possa avere per bersaglio molecole non perfettamente complementari) complica questa situazione.

I siRNA in linea teorica possono essere funzionali indipendentemente dalla regione dell'mRNA alla quale si appaiono, infatti il taglio endonucleolitico che segue al loro appaiamento con l'mRNA bersaglio genera due molecole di RNA che essendo prive rispettivamente di coda di polyA (il frammento 5') e di CAP (il frammento 3') sono rapidamente degradate dalla cellula. Tuttavia, gli mRNA all'interno del citoplasma non sono presenti in forma lineare, ma formano complesse strutture tridimensionali. Nella struttura tridimensionale di una molecola di RNA si riconoscono tipicamente due livelli di organizzazione: una struttura secondaria, determinata dalla formazione di brevi regioni a doppia elica tra porzioni complementari della molecola secondo gli appaiamenti di Watson e Crick, e una struttura terziaria, determinata da come le regioni a doppia elica si organizzano nello spazio.

Poiché per un corretto appaiamento tra la molecola di siRNA e l'mRNA bersaglio è necessario che la porzione dell'mRNA complementare al siRNA sia disponibile all'appaiamento, si tenta di disegnare siRNA che siano complementari a regioni dell'mRNA bersaglio caratterizzate da una struttura secondaria particolarmente debole. Sono stati messi a punto algoritmi e software che permettono di disegnare siRNA indirizzati contro le regioni più opportune di un RNA messaggero. La situazione è resa più complessa dal fatto che la maggior parte dei geni umani dà luogo a molteplici molecole di mRNA diverse. Tali molecole possono differire tanto per la lunghezza (siti di inizio o di terminazione della trascrizione alternativi) quanto per la composizione nucleotidica al loro interno (come conseguenza di eventi di splicing alternativi). Per ottenere un risultato affidabile, è necessario disegnare siRNA che abbiano per bersaglio una porzione dell'mRNA di interesse che sia presente in tutte le molecole di mRNA che possano dar luogo a una proteina funzionale. Questo

obiettivo può essere raggiunto utilizzando un cocktail di diversi siRNA che hanno per bersaglio regioni diverse dell'mRNA messaggero.

Una delle problematiche più rilevanti a proposito dell'utilizzo di siRNA in terapia è quello dei cosiddetti "off targets", vale a dire di quegli effetti sulla fisiologia cellulare dovuti non alla degradazione specifica della molecola bersaglio, ma all'azione del siRNA su molecole diverse. Poiché i siRNA sono piccole molecole di RNA con caratteristiche biochimiche identiche a quelle dei microRNA, è possibile che la cellula possa "utilizzarli" appunto come miRNA. In sostanza i siRNA introdotti all'interno della cellula potrebbero modulare in maniera fine l'espressione di molecole di RNA per appaiamento parziale. Sono in corso studi in proposito che tentano di stabilire quale sia effettivamente l'impatto di questi fenomeni sulla fisiologia cellulare.

Un'ulteriore possibile sorgente di effetti aspecifici è l'attivazione dell'immunità innata a livello sistemico (vedi paragrafo Farmacocinetica e tossicologia sistemica).

Inibizione dell'attività biologica di miRNA tramite oligonucleotidi complementari

I miRNA agiscono come modulatori negativi dell'espressione genica a livello post-trascrizionale, sono coinvolti nella regolazione di meccanismi chiave, dalla proliferazione al metabolismo, dal differenziamento alla tumorigenesi

È stato recentemente dimostrato che il genoma umano codifica per una classe di piccoli RNA non codificanti, chiamati microRNA (miRNA). I miRNA svolgono un ruolo cruciale all'interno delle cellule eucariotiche. Nell'uomo sono a oggi stati identificati circa mille miRNA diversi. I miRNA riconoscono gli mRNA bersaglio per complementarità secondo appaiamenti Watson-Crick. Appare quindi evidente che la tecnica d'elezione per inibirne la funzione è quella di somministrare alla cellula un eccesso di RNA perfettamente complementare al miRNA da inibire. L'introduzione di modificazioni chimiche, e in particolare l'uso di LNA (*Locked Nucleic Acids*, dettagliatamente descritti nel paragrafo Struttura chimica generale), caratterizzati da una elevatissima stabilità delle molecole ibride LNA/RNA consente di sequestrare efficacemente e specificamente un particolare miRNA. Questo approccio è stato dimostrato essere funzionante in vivo nei topi. La somministrazione per via sistemica endovenosa di un oligonucleotide sintetico complementare al miR-122 ha specificamente interferito con i processi epatici regolati da questo miRNA mostrando elevata specificità e assenza di tossicità.

Questo tipo di approccio è particolarmente promettente in quanto i miRNA sono stati coinvolti in numerosissime patologie umane. Poiché un singolo miRNA ha la possibilità di regolare anche centinaia di geni diversi con un effetto drammatico sulla fisiologia cellulare, la messa a punto di oligonucleotidi specifici che possano interferire con singoli miRNA è un obiettivo chiave.

Oligonucleotidi antisenso come strumento per modificare i pattern di splicing

L'uso di oligonucleotidi complementari per ripristinare un mRNA funzionale o per mascherare opportunamente sequenze consensus per lo splicing è un approccio terapeutico promettente

Gli mRNA eucariotici sono trascritti sotto forma di precursori (pre-mRNA) contenenti porzioni di RNA codificanti per la relativa proteina (esoni) e porzioni di RNA che saranno rimosse prima dell'esporto dell'mRNA maturo nel citoplasma (introni). La rimozione degli introni avviene tramite il processo dello splicing. Questo importante passaggio della maturazione degli mRNA è portato a termine nel nucleo da un complesso macchinario ribonucleoproteico. Al fine della corretta rimozione degli introni è cruciale il riconoscimento, da parte del macchinario di splicing, di sequenze consensus che marciano i confini tra introni ed esoni. In corrispondenza delle giunzioni introne/esone si trovano sequenze conservate necessarie per la corretta esecuzione dello splicing. In particolare, laddove il macchinario trova una transizione esone/introne, catalizzerà la reazione di rimozione di quest'ultimo identificando la transizione introne/esone immediatamente successiva procedendo in direzione 3' sul pre-mRNA. È possibile utilizzare oligonucleotidi antisenso, complementari a tali regioni consensus, per mascherarle e di conseguenza alterare il pattern di splicing di specifici mRNA (Figura 21.1). Se ad esempio una transizione introne/esone è mascherata, il macchinario di splicing ignorerà l'esone in questione e procederà alla rimozione dello stesso insieme ai due introni che lo fiancheggiano. In alcune patologie ereditarie sono coinvolte mutazioni che impediscono il corretto splicing. L'uso di

oligonucleotidi complementari per ripristinare un mRNA funzionale è un approccio terapeutico promettente. Ad esempio, circa la metà delle mutazioni a carico del gene ATM, responsabili della ataxia-telangiectasia, determinano alterazioni nello splicing. Approcci in vitro hanno dimostrato che oligonucleotidi antisenso in grado di ripristinare lo splicing corretto, seppur a efficienze relativamente basse, permettono di ripristinare livelli di proteina funzionante sufficienti a indurre la reversione del fenotipo patologico.

Viceversa in patologie nelle quali si osservino mutazioni in un particolare esone è possibile usare oligonucleotidi a RNA per mascherare opportunamente sequenze consensus per lo splicing e, rimuovendo uno o più esoni, generare una proteina difettiva di alcune regioni, ma che può ritenere una attività biologica sufficiente ad attenuare il fenotipo patologico associato alla mutazione (Figura 21.1). Un approccio di questo tipo è stato tentato con successo nel caso della distrofia muscolare di Duchenne.

Aptameri

Piccole molecole di RNA possono interagire direttamente con le proteine

Gli aptameri sono piccole molecole di RNA che, in condizioni fisiologiche, assumono strutture terziarie che li rendono capaci di interagire selettivamente con bersagli molecolari intracellulari, tipicamente proteine. In pratica non si tratta di altro che di una strategia che, sfruttando la straordinaria plasticità delle molecole di RNA, tenta di isolare oligonucleotidi che interagendo con una specifica proteina bersaglio ne inibiscano l'attività. Il processo di sviluppo di tali molecole, noto come SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), prevede di

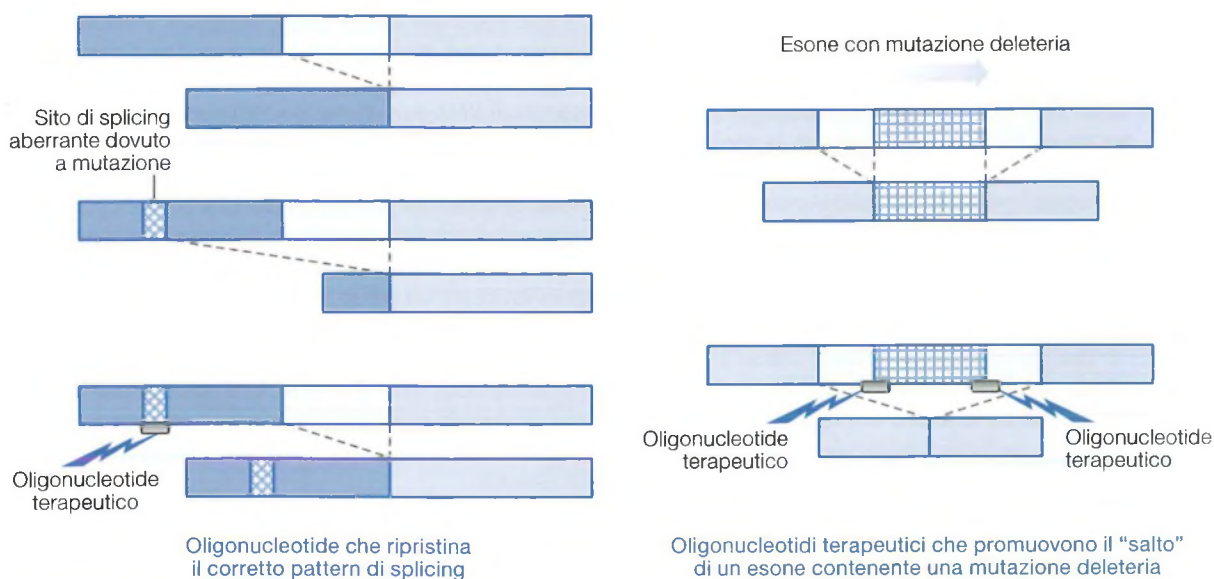


FIGURA 21.1 Meccanismi d'azione di RNA disegnati per alterare il pattern di splicing. Le molecole di RNA agiscono mascherando per appaiamento regioni dell'RNA precursore contenenti sequenze consensus specifiche. A sinistra: strategia per ripristinare il corretto pattern di splicing in seguito a mutazioni che lo abbiano compromesso. A destra: strategia per indurre l'esclusione di specifici esoni (contenti mutazioni dannose) dal trascritto maturo.

TABELLA 21.1 Oligonucleotidi/siRNA in fase di trial clinico per l'utilizzo nella terapia di patologie

Aziende	Prodotto	Gene bersaglio	Patologia	Tipo di somministrazione	Stato
Alnylam Pharmaceuticals	ALN-RSV01	RSV	Infezione da RSV	Intranasale	Fase II
ZaBeCor	Excellair	SYK kinase	Asma	Inalazione	Fase II
Alnylam Pharmaceuticals	ALN-VSP01	VEGF e KSP	Cancro epatico	Endovenosa	Fase I
Quark Pharmaceuticals	RTP801i-14	RTP801	AMD	Intraoculare	Fase I
Quark Pharmaceuticals	QPI-1002	p53	Insufficienza renale acuta	Endovenosa	Fase I
Calando Pharmaceuticals	CALAA-01	M2 subunit of ribonucleotide reductase	Tumori solidi	Endovenosa	Fase I
Nucleonics	NUC B1000	HBV	Infezione da HBV	Endovenosa	Fase I
TransDerm	TD101	Single nucleotide mutation in the keratin 6a	PC	Intradermica	Fase I
Silence	Atu-027	PKN3	Tumori solidi	Endovenosa	Fase I
Tekmira	ApoB SNALP	ApoB	Ipercolesterolemia	Endovenosa	Fase I
Sylentis	SYL-040012	ADRB2	Glaucoma	Intraoculare	Fase I
Quark Pharmaceuticals	QPI-1007	Caspase-2	Glaucoma	Intraoculare	Fase I

utilizzare il ligando di interesse (una proteina la cui attività enzimatica deve essere inibita, ad esempio) per selezionare all'interno di una popolazione casuale ed eterogenea di molecole di RNA quelle che a tale ligando si legano con maggiore affinità. Le molecole legate sono raccolte, amplificate e selezionate nuovamente con lo stesso metodo per diversi cicli. A ogni ciclo ci sarà un arricchimento specifico per quelle sequenze che con la massima affinità legano il ligando. Infine, per sequenziamento si identificano quelle sequenze che risultano essere i migliori candidati per saggiarne l'attività farmacologica. A oggi esistono alcuni aptameri correntemente utilizzati in terapia e molti altri sono in corso di sviluppo (Tabella 21.1).

Veicolazione

Il corretto drug delivery degli oligonucleotidi è una tappa essenziale per il loro sviluppo come farmaci

Una strategia per migliorare l'efficienza di assorbimento cellulare è quella di associare all'oligonucleotide sostanze biologicamente inerti favorevoli al trasporto ed eventualmente la stabilità. Il *drug delivery* è diventato, nel corso degli ultimi anni, un'autonoma e vasta disciplina scientifica (vedi anche Capitolo 50). Come per altri composti a uso farmacologico, si possono distinguere sistemi di veicolazione e sistemi di coniugazione. Nel primo caso l'oligonucleotide, polianione altamente idrofilo, viene miscelato e incorporato, senza stabilire un legame covalente, con composti lipofili o comunque utili alla veicolazione, mentre la coniugazione prevede la formazione di uno specifico legame chimico tra l'oligonucleotide e la molecola carrier.

I *liposomi* sono strutture lipidiche sferoidali con la possibilità di contenere all'interno grandi quantità di sostanze idrofile, inclusi gli oligonucleotidi. Infatti la capacità di veicolare DNA è stata tra le prime utilizzazioni dei

liposomi e costituisce ancora oggi uno dei sistemi di trasporto per la terapia genica. Sebbene l'incapsulamento di oligonucleotidi all'interno dei liposomi non sia molto efficiente, la protezione da nucleasi e la diretta veicolazione all'interno delle cellule li rendono uno strumento molto interessante. In pratica sono utilizzati i lipidi cationici per la loro capacità di interagire più facilmente con le cariche negative delle membrane biologiche. I composti più noti sono il DOTMA (N[1(2,3-dioleossipropil)N,N-dimetil ammoniocloruro] mescolato con DOPE (dioleil fosfatidiletanolamina). La semplice miscela dei due composti, lipofectina, viene molto utilizzata per la veicolazione di oligonucleotidi in sistemi cellulari.

Le *nanoparticelle* sono veicolanti colloidali con dimensioni inferiori a 1 μm , nell'ambito quindi dei nanometri. Vengono oggi utilizzate preparazioni di nanoparticelle costituite da polialchilcianoacrilato, per la facilità di preparazione, il basso costo e la totale biodegradabilità. L'esteso utilizzo di suture chirurgiche a base di questo composto garantisce la sua innocuità. Recentemente sono state proposte nanoparticelle derivatizzate in modo da portare brevi catene glicidiche a carica positiva in grado di legare gli oligonucleotidi che hanno carica negativa.

La *coniugazione* con una molecola idonea viene utilizzata allo scopo di migliorare le proprietà farmacocinetiche degli oligonucleotidi. Le strategie sono dirette a migliorare l'assorbimento, la stabilità biologica, la veicolazione su target cellulari specifici o addirittura su strutture subcellulari. Oltre che attraverso legami covalenti, la coniugazione di un oligonucleotide può essere realizzata attraverso la formazione di legami elettrostatici tra l'oligonucleotide (polianione) e un policatione che a sua volta può legare covalentemente una opportuna molecola. Tuttavia si deve ritenere che gli oligonucleotidi coniugati possono considerarsi molecole differenti a seconda della funzione svolta dalla molecola coniugante oltre che della posizione coinvolta nella formazione del legame. Appare forse su-

perfluo rilevare che la formazione di una molecola ibrida oligonucleotide vettore non deve alterare le proprietà ibridizzanti degli ON, conferire significativi effetti tossici, antigenicità, e in breve deve apportare vantaggi ben definiti. Il colesterolo e analoghi hanno quindi lo scopo primo di aumentare l'uptake cellulare attraverso un potenziamento del passaggio passivo e secondariamente di accrescere la stabilità. La coniugazione con ligandi biologici si propone di potenziare l'uptake per endocitosi ed eventualmente l'uptake selettivo da parte di specifiche popolazioni cellulari che esprimono il relativo recettore. Tra i più usati sono la transferrina, l'acido folico, fattori di crescita ecc. Recentemente sono entrati in fase di sperimentazione metodi che fanno uso di batteri transgenici i quali sintetizzano siRNA direttamente in situ (nel caso specifico l'apparato digerente del paziente) che possono essere somministrati per via orale. Naturalmente questo approccio è per ora limitato al trattamento di patologie (tumore del colon) a carico dell'intestino.

Struttura chimica generale

La struttura molecolare e le proprietà fisico-chimiche sono comuni a tutti gli oligonucleotidi, indipendentemente dalla strategia di impiego

Gli attuali oligonucleotidi allo studio sono polimeri anionici, a peso molecolare compreso tra i 5000 e i 20.000, sintetizzati in modo automatico attraverso reazioni sequenziali su supporti solidi. Vengono studiati, analizzati e purificati con le metodologie degli acidi nucleici. La struttura molecolare determina aspetti peculiari relativi alla stabilità in ambiente biologico e al superamento delle membrane biologiche. Le nuove strategie farmacologiche sono basate su molecole con proprietà chimico-fisiche, azione su cellule in coltura e farmacotossicologia sistemica molto simili. L'obiettivo,

ormai ben delineato, è il progressivo miglioramento di una serie di parametri che consentiranno di trasformare le intuizioni scientifiche, già tradotte in composti molto efficaci in sistemi sperimentali, in farmaci di grande prospettiva per la terapia. La difficoltà che si incontra nell'introdurre gli oligonucleotidi nelle cellule (uptake) è dovuta alle dimensioni e alla natura polianionica, sostanze idrosolubili non in grado di diffondere attraverso membrane cellulari. I meccanismi di uptake cellulare sono ancora poco noti ma sicuramente non efficienti per un uso ottimale. Pertanto tra i principali obiettivi vi è l'aumento della concentrazione intracellulare rispetto alla concentrazione extracellulare attraverso la modifica della struttura chimica o mediante veicolazione con una molecola carrier o con sostanze e preparati altamente lipofili. L'integrità degli oligonucleotidi in ambiente biologico dipende principalmente dall'attività degli enzimi ubiquitari: *esonucleasi*, che degradano l'oligonucleotide dalle estremità, oppure *endonucleasi*, che scindono la molecola dall'interno della catena. Le nucleasi, pur variando con il tipo cellulare, sono ubiquitarie all'interno della cellula e sulla membrana, nei liquidi biologici, in particolare il plasma, nei terreni di coltura. La strategia è stata diretta a modificare la struttura chimica degli oligonucleotidi per acquisire stabilità biologica. Appare evidente che le modifiche chimiche non devono alterare la capacità di ibridizzare le strutture bersaglio.

Per utilizzare gli oligonucleotidi come farmaci è necessario modificarli chimicamente

Si deve considerare che ogni alterazione della struttura originaria comporta delle conseguenze spesso inattese; le modifiche inevitabilmente influiscono sulle caratteristiche chimico-fisiche della molecola che si ripercuotono sulla attività biologica della stessa. Le modifiche chimiche si propongono spesso di migliorare, in modo congiunto, l'uptake cellulare e la stabilità con l'obiettivo di preparare un prodotto ottimale per le attività biologiche e farmaco-

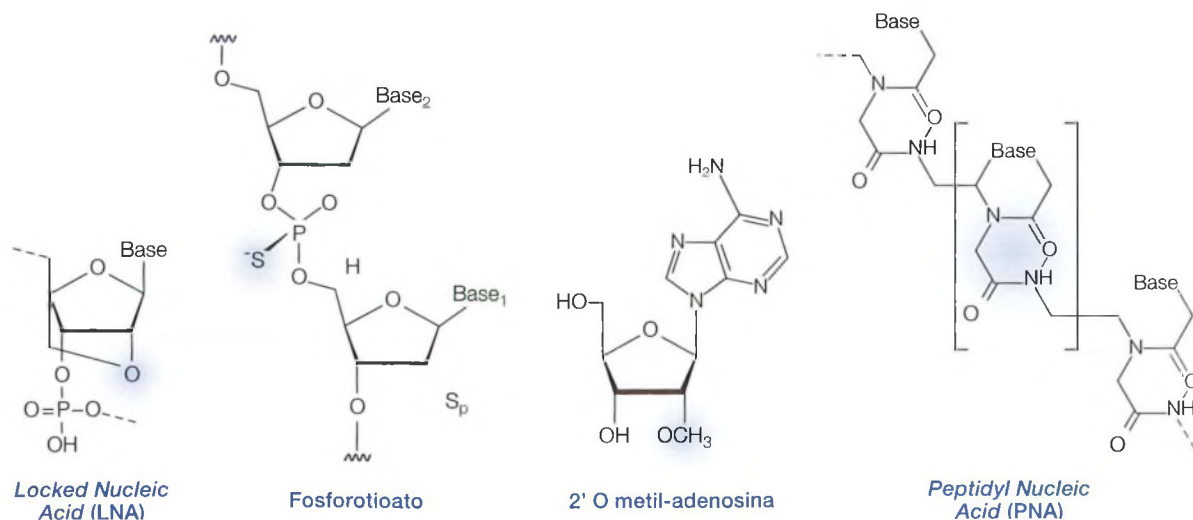


FIGURA 21.2 Alcune delle modifiche più comunemente introdotte in oligonucleotidi terapeutici. In blu è evidenziata la parte della molecola oggetto della modifica. Per dettagli sulle singole modificazioni fare riferimento al testo.

logiche. Sinora sono state apportate modifiche ai gruppi ossidrilici del fosforo e dell'ossidrile 2' del ribosio e in minor misura alle basi stesse. Nel progettare le più recenti modifiche sono state impiegate simulazioni al computer della struttura molecolare per disegnare composti del tutto innovativi, non presenti in natura. Tra i composti maggiormente utilizzati ricordiamo i fosforotioati, i fosforoamidati, i *locked nucleic acid* e i *Peptidyl Nucleic Acid* (PNA) e i 2'-O-alcilribonucleotidi (Figura 21.2).

Fosforotioati

I fosforotioati sono analoghi degli ODN naturali in cui uno degli ossigeni non a ponte del legame fosfodiesterico è rimpiazzato da un atomo di zolfo. I fosforotioati presentano il problema della diastereoisomeria al fosforo e, quindi, vengono normalmente impiegate le miscele diastereoisomeriche. Gran parte della popolarità dei fosforotioati deriva dalla stabilità alle nucleasi, dalla facilità di sintesi, dalla discreta capacità ibridizzante e dalla capacità di attivare l'enzima Rnasi H. Per quanto riguarda l'uptake, gli oligo-fosforotioati vengono assorbiti con minore efficienza dei normali fosfodiesteri.

Fosforoamidati

I fosforoamidati sono analoghi degli ODN naturali in cui l'ossigeno a ponte del legame fosfodiesterico è rimpiazzato da un atomo di azoto. Questa modifica a sua volta consente ulteriori sostituzioni all'azoto con la possibilità di ottenere nuove modifiche. Le proprietà biologiche dei composti fosforoamidati non si discostano molto da quelle dei fosforotioati e non sembrano offrire vantaggi particolari.

2'-O-alcilribonucleotidi

I 2'-O-alcilribonucleotidi sono una classe di derivati dell'RNA in cui l'ossidrile 2' è eterificato con un gruppo alcilico, tra i più utilizzati il metile (-CH₃) e l'allile (-CH₂-CH=CH₂). Sono composti con stabilità chimica simile al DNA, sono resistenti alle nucleasi e, in generale, la lunghezza della catena alcilica aumenta sia la lipofilità che la resistenza alle nucleasi. Il loro impiego trova indicazione in strategie basate su composti a base di RNA o per sostituire alcune basi in ON a base di DNA.

Locked nucleic acids

I *Locked Nucleic Acids* (LNA) sono una classe di analoghi degli acidi nucleici nei quali l'anello di ribosio è "bloccato" (locked) da un ponte metilene che connette l'atomo di ossigeno 2' con il carbonio 4'. Questa modifica riduce drasticamente la plasticità della molecola bloccando il ribosio nella conformazione più favorevole alla ibridazione in molecole a doppio filamento. Di conseguenza gli oligonucleotidi contenenti uno o più residui modificati a LNA formano ibridi DNA-LNA e RNA-LNA particolarmente stabili. La modifica LNA trova particolarmente uso nell'interferire con l'attività dei microRNA. Infatti, brevi molecole a LNA complementari a specifici miRNA sono in grado di sequestrarli all'interno della cellula e di inibirne efficientemente l'attività.

Peptidil nucleic acid

I *Peptidil Nucleic Acid* (PNA) presentano un disegno molto originale derivato da molecular modelling. La struttura chimica è fondata sulla sostituzione dello scheletro fosfodiesterico con uno scheletro di tipo peptidico nel quale le basi mantengono tra loro la distanza del DNA naturale e sono quindi in grado di riconoscere le basi complementari sul filamento opposto. La struttura risultante è di natura non ionica, stabile alle nucleasi, alle proteasi e alle peptidasi. I vantaggi di questi derivati sono: facilità di sintesi, modulabilità delle proprietà chimico-fisiche, maggiore stabilità dei complessi PNA/DNA e PNA/RNA. La sostanziale incapacità, nelle strutture sinora studiate, di superare le barriere biologiche e di attivare la Rnasi H, ne ha reso molto problematico lo studio in sistemi cellulari e impedito gli studi in vivo. Attualmente l'interesse applicativo principale è a scopo diagnostico per la grande stabilità con le sequenze complementari e a scopo di studio per le innovative caratteristiche chimico-fisiche che consentono la formazione di interazioni secondo modalità non convenzionali.

L'incorporazione di basi modificate all'interno di una sequenza può essere un altro modo per migliorare le caratteristiche farmacocinetiche degli ON. Ancora ai primi tentativi e quindi con scarsi dati disponibili, l'obiettivo resta comunque quello di mantenere inalterato l'appaiamento tra basi complementari secondo il modello di Watson e Crick. Gli atomi di carbonio 5 e 6 delle pirimidine consentono modificazioni che, insieme ad altre proprietà, rendono il nucleoside più lipofilo facilitandone la penetrazione attraverso le membrane cellulari. Recenti misure indicano anche che le 5-Me-pirimidine danno duplex più stabili a causa dello spiazzamento dal solco maggiore di molecole d'acqua altamente ordinate. Froheler ha perciò tentato di sfruttare questo fenomeno introducendo il gruppo propino nella posizione 5 della desossicitidina e della desossiuridina. Gli effetti di queste sostituzioni sono stati studiati nella formazione di doppie e triple eliche con buoni risultati, seppur preliminari, anche nei sistemi cellulari.

La coniugazione covalente con molecole varie è stata sfruttata per tentare di facilitare l'ingresso di oligonucleotidi all'interno della cellula. Particolarmente promettente è risultata la coniugazione covalente con il colesterolo che, pur non interferendo con l'attività biologica degli oligonucleotidi, ne accresce grandemente la solubilità nella membrana plasmatica, favorendo l'ingresso all'interno delle cellule.

Farmacotossicologia

■ Molti studi, poche certezze

Una molecola dotata di attività biologica può trovare effettiva applicazione clinica solo se risponde a una rigorosa serie di requisiti di idoneità che sono verificabili attraverso un iter lungo, costoso, e a esito spesso negativo. Per quanto gli oligonucleotidi rappresentino un paradigma farmacologico nuovo, anche a tali molecole

devono essere applicate le valutazioni di farmacocinetica, farmacodinamica e tossicologia che regolano le fasi di sviluppo di un farmaco.

Farmacologia cellulare

Gli oligonucleotidi sono polimeri di cospicue dimensioni, identici, o quantomeno assai simili, ai normali prodotti di frammentazione degli acidi nucleici presenti nella cellula integra o generati dai procedimenti estrattivi. Il loro rilevamento all'interno della cellula, in particolare la determinazione della molecola integra, presenta qualche difficoltà e ha richiesto l'etichettatura della molecola o con traccianti radioattivi o con gruppi fluorescenti. Per le dimensioni molecolari e la natura polianionica, l'*uptake* cellulare dei vari oligonucleotidi non supera il 3% della concentrazione extracellulare. L'assorbimento è tempo, dose e temperatura (energia) dipendente. Le modifiche apportate alla molecola per accrescere l'assorbimento cellulare non hanno ancora ottenuto i risultati sperati. Molti studi hanno affrontato il meccanismo di assorbimento cellulare che tuttavia rimane ancora poco noto. Accanto a una modesta quantità assorbita per diffusione passiva, la grande maggioranza degli oligonucleotidi viene assorbita per endocitosi mediata da diversi recettori a bassa affinità e anche per pinocitosi. La distribuzione degli oligonucleotidi all'interno dei vari compartimenti cellulari è anch'essa oggetto di molti studi e di poche certezze. L'ipotesi più condivisa ritiene che gli ON si localizzino in una prima fase prevalentemente negli endosomi e che, dopo fusione con i lisosomi e parziale degradazione, vengano liberati nel citoplasma. L'emivita è decisamente influenzata dalla natura chimica dell'oligonucleotide. I composti fosforodiesteri vengono catabolizzati in pochi minuti mentre i fosforotioati e i 2'-O-alcil derivati resistono intatti per alcune ore. Processi di efflusso sono stati dimostrati molto chiaramente e rispettano a grandi linee le caratteristiche dell'*uptake*.

Tossicità e mutagenicità

Effetti tossici emersi nella prima fase di studio si sono significativamente ridotti con il migliorare dei processi di purificazione. Si possono distinguere due tipi di tossicità cellulare: la prima di carattere generale, dovuta a interferenza degli oligonucleotidi o dei loro cataboliti con proteine cellulari; la seconda prodotta dalle alterazioni che molecole dell'informazione possono indurre stabilmente nel genoma. Vanno ovviamente esclusi gli effetti dovuti alla specificità di sequenza dell'oligonucleotide, per i quali l'effetto tossico è conseguenza diretta dell'azione farmacologica desiderata. Una tossicità sequenza-dipendente deriva dalle proprietà aptameriche dell'oligonucleotide. Molti oligonucleotidi usati come controllo hanno rivelato la capacità di legare in modo specifico proteine cellulari causando alterazioni alle funzioni cellulari. In particolare i fosforotioati si legano alle proteine plasmatiche e cellulari anche in modo sequenza-aspecifico comportandosi come composti di tipo eparinico. I residui nucleotidici

liberati nel processo catabolico degli oligonucleotidi possono determinare sovraccarico all'interno della cellula e interferire con funzioni metaboliche vitali. Un supposto potere mutageno non è stato confermato.

Farmacocinetica e tossicologia sistemica

L'emivita plasmatica degli oligonucleotidi naturali somministrati per via endovenosa è assai breve, a causa della degradazione da parte delle nucleasi sieriche e per captazione dai tessuti periferici. Gli studi volti a definire il profilo farmacocinetico di composti stabili sono stati eseguiti prevalentemente con oligonucleotidi fosforotioati e si possono considerare definitivi. Gli studi farmacocinetici nell'uomo hanno confermato il favorevole comportamento e le curve cinetiche ottenute negli animali. Si è potuto dimostrare che gli oligonucleotidi si distribuiscono in tutti gli organi salvo il SNC e si concentrano in maggiore quantità nel fegato, nel rene e proporzionalmente nel midollo osseo. Si è osservato un cospicuo legame dei fosforotioati alle proteine plasmatiche, in particolare l'albumina e la β 2-microglobulina, che renderebbe ragione della scarsa *clearance* renale e farebbe inoltre supporre un ruolo di *reservoir* per il plasma. In definitiva la farmacocinetica degli oligonucleotidi è risultata decisamente molto favorevole, dissipando gli iniziali scetticismi dovuti alle dimensioni molecolari e alla natura chimico-fisica. È da segnalarsi tuttavia che siRNA sintetici sono riconosciuti efficacemente da *Toll Like Receptor 7* (TLR-7) e TLR-8, determinando una produzione di citochine proinfiammatorie da parte di cellule dell'immunità innata (vedi Capitoli 6 e 47). Questo effetto è mitigato dall'introduzione di modificazioni in posizione 2'O sull'anello di ribosio degli oligonucleotidi sintetici. Oggi possiamo disporre di vaste sperimentazioni sull'uomo. I composti fosforotioati sono stati somministrati fino a dosi di 9 mg/kg in singola dose e 3 mg/kg a dosi ripetute, per somministrazione lenta per via endovenosa. Le sperimentazioni concordano nel non rilevare effetti tossici a lungo termine mentre compaiono *sintomatologie reversibili* in fase di somministrazione. Esse sono: ipotensione non molto rilevante, febbre per liberazione di interleuchine 1 e 6, modesta attivazione della frazione 3 del complemento, leggera piastrinopenia, affaticabilità. In conclusione gli studi farmacocinetici e farmacotossicologici nell'uomo hanno confermato le osservazioni fatte negli animali da laboratorio (DL50 180-360 mg/kg nel topo e ratto, 40 mg/kg nella scimmia) e nel complesso sono risultati molto favorevoli, anche in misura superiore a quanto atteso.

Applicazioni correnti e prospettive future

L'ambiziosa speranza della comunità scientifica è quella di aver identificato uno strumento che permetta un disegno razionale relativamente semplice, standardizzato e veloce per ottenere rapidamente farmaci specifici contro ogni singolo gene.

Già oggi molti oligonucleotidi sono entrati in trial clinici di I e di II fase. Recentemente è stato riportato il trattamento in fase operatoria di pazienti affetti da glioma con siRNA diretti contro l'oncogene tenascin C. Tale studio ha dimostrato un significativo miglioramento dell'aspettativa di vita nei pazienti trattati con siRNA. La Silence Therapeutics ha allo studio un farmaco basato su siRNA contro il gene PKN3 per il trattamento della metastasi epatica del tumore del colon retto. Per il trattamento dell'asma è in fase di sperimentazione un siRNA diretto contro la chinasi SYK somministrato per inalazione.

Sono allo studio trattamenti combinati con molti siRNA differenti contro diversi oncogeni contemporaneamente che potrebbero trovare applicazione nel trattamento di

glioma e tumore al seno. Per un elenco più esteso dei trial clinici in corso si rimanda alla tabella 21.1.

Certamente alcuni degli ostacoli più difficili da superare in questo contesto sono l'efficienza relativamente scarsa con cui si riesce a somministrare oligonucleotidi a molti tipi cellulari, la breve emivita di tali molecole nell'ambiente extracellulare e l'attivazione indesiderata di risposte immunitarie, compresa la produzione di citochine proinfiammatorie.

Tuttavia le modifiche chimiche e nuove formulazioni per la veicolazione di oligonucleotidi in vivo lasciano intravedere un futuro nel quale il trattamento di patologie tramite la somministrazione di oligonucleotidi potrà essere una realtà.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Il complesso RISC, usando piccoli RNA (siRNA, miRNA) come "sonde" molecolari, riconosce specifici mRNA e ne induce il silenziamento attraverso degradazione o inibizione traduzionale.
- ▶ Piccole molecole (22 nucleotidi) di RNA (*small interfering RNA*, siRNA) possono essere introdotte in cellule di mammifero e usate per "spegnere" l'espressione di geni con elevata specificità.
- ▶ L'utilizzo di una tecnica denominata SELEX permette di isolare piccole molecole di RNA capaci di legare specifiche proteine inibendone l'attività biologica. Queste piccole molecole di RNA, note come aptameri, sono una promettente nuova sorgente di farmaci per il futuro.
- ▶ Piccole molecole di RNA complementari a particolari regioni del pre-mRNA possono alterarne il pattern di splicing in vivo. Tali molecole trovano applicazione nella cura di particolari malattie genetiche.
- ▶ Modifiche chimiche possono alterare le proprietà degli acidi nucleici e sono utilizzate per aumentare la stabilità in vitro o migliorare il veicolamento di oligonucleotidi in vivo.

Bibliografia essenziale

- ▶ Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:259-93.
- ▶ Bouchard PR, Hutabarat RM, Thompson KM. Discovery and development of therapeutic aptamers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:237-57.
- ▶ Dausse E, Da Rocha Gomes S, Toulmé JJ. Aptamers: a new class of oligonucleotides in the drug discovery pipeline? *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:602-7.
- ▶ Du L, Gatti RA. Progress toward therapy with antisense-mediated splicing modulation. *Curr Opin Mol Ther* 2009;11:116-23.
- ▶ Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438(7068):685-9.
- ▶ Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol* 2007;17:118-26.
- ▶ Tiemann K, Rossi JJ. RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol Med* 2009;1:142-51.
- ▶ Veedu RN, Wengel J. Locked nucleic acid as a novel class of therapeutic agents. *RNA Biol* 2009;6:321-3.
- ▶ Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:129-38.

SEZIONE

6

Controllo farmacologico del trasporto attraverso le membrane cellulari

CAPITOLO 22

I canali ionici

Maurizio Tagliatela, Enzo Wanke

CAPITOLO 23

I trasportatori di membrana

Lucio Annunziato, Giuseppe Pignataro, Gianfranco Di Renzo

CAPITOLO 24

I neurotrasportatori

Gaetano Di Chiara

6

I canali ionici

Maurizio Tagliatela, Enzo Wanke

Obiettivi formativi

- ▶ Conoscere i principi fondamentali di funzionamento, l'organizzazione strutturale e la classificazione dei canali ionici
- ▶ Descrivere il ruolo svolto dai principali tipi di canali ionici a livello dei diversi organi e tessuti
- ▶ Apprendere le principali modifiche funzionali conseguenti alla modulazione farmacologica di specifiche classi di canali ionici
- ▶ Comprendere come tali modifiche funzionali possano tradursi in usi terapeutici delle diverse classi di farmaci attivi sui canali ionici

■ Differenze tra trasportatori e canali ionici

L'ineguale distribuzione di specie ioniche ai due lati della membrana cellulare e le variazioni dinamiche di tale distribuzione consentono l'adeguato funzionamento, sopravvivenza e replicazione di tutte le cellule eucariote. Il fatto che circa il 30% dell'energia spesa dalla cellula sia impiegata per mantenere i gradienti transmembrana di sodio (Na^+), potassio (K^+), cloro (Cl^-) e calcio (Ca^{2+}) sottolinea l'enorme ruolo funzionale di tali processi.

In base a criteri puramente termodinamici, i meccanismi di trasporto transmembrana vengono classificati in attivi o passivi. Il *trasporto passivo* determina il movimento dei soluti da un lato della membrana avente un elevato potenziale elettrochimico verso quello a basso potenziale

elettrochimico. Due tipi di proteine di membrana sono responsabili del trasporto passivo: i *trasportatori facilitati* e i *canali ionici* (Figura 22.1). Il meccanismo con il quale tale trasporto avviene attraverso le due proteine è fondamentalmente diverso. Il legame del substrato a un trasportatore facilitato da un lato della membrana induce una modifica conformazionale che espone il substrato dall'altro lato della membrana. Il gradiente di concentrazione del substrato fornisce l'energia necessaria per tale processo; essendo il movimento del substrato accoppiato alle modifiche conformazionali della proteina, la velocità di trasporto del trasportatore facilitato è relativamente bassa. Viceversa, i canali ionici contengono dei pori acquosi che permettono la diffusione dei substrati (ovvero degli ioni permeanti) a un'elevata velocità, dell'ordine anche superiore a $10^6/\text{s}$;

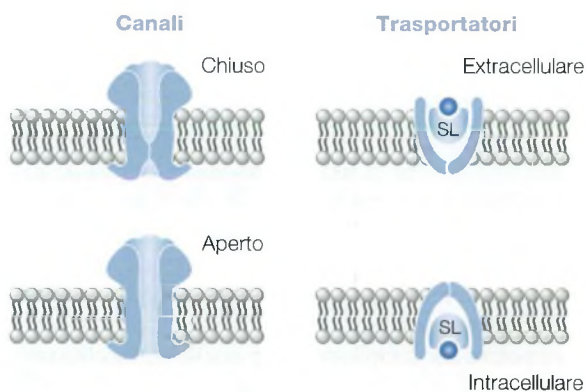


FIGURA 22.1 Canali ionici e trasportatori ionici. Lo schema mostra le differenze concettuali tra canali e trasportatori ionici. Per un canale ionico, gli ioni diffondono attraverso il poro, la cui apertura viene controllata da un singolo cancello. Nei trasportatori, il flusso viene controllato da almeno due cancelli, la cui attivazione viene coordinata in maniera da impedire la formazione di un poro polare ad alta conduttanza. Il pallino blu rappresenta il substrato da trasportare che si lega al proprio sito di legame (SL) all'interno della via di permeazione. (Da: Chen TY, Hwang TC. CLC-0 and CFTR: chloride channels evolved from transporters. *Physiol Rev* 2008;88:351-87, modificata)

tale elevata velocità di flusso genera correnti significative (identificabili come correnti unitarie di singolo canale), che possono produrre in breve tempo un cambiamento del potenziale di riposo (V_{REST}) di una cellula.

Entrambi tali processi passivi dissipano il gradiente energetico creato dai trasportatori attivi, i quali pompano gli ioni attraverso la membrana contro il loro gradiente di concentrazione; perché tale processo si compia, è necessario un input energetico fornito generalmente dall'idrolisi dell'ATP (trasportatori attivi primari) o accoppiando il flusso netto di un soluto che viene trasportato contro gradiente a quello di un altro che si muove assecondando il proprio gradiente elettrochimico; in tale condizione, i due soluti possono muoversi nella stessa direzione ("cotrasporto" o "sinporto") o in direzione opposta ("controtrasporto" o "antiporto").

Con il progresso degli studi strutturali e funzionali del trasporto di membrana negli ultimi 10-15 anni, la linea di demarcazione tra i canali e i trasportatori ionici è divenuta progressivamente più sottile. Studi recenti hanno dimostrato che alcune tossine possono convertire un trasportatore in un canale ionico e che nella stessa famiglia strutturale possono coesistere trasportatori e canali ionici. Ad esempio, nella famiglia delle proteine trasportatrici denominate ABC (*ATP-Binding Cassette*) il canale CFTR (*Cystic Fibrosis Trans Membrane Regulator*, codificato dal gene mutato nella fibrosi cistica) è l'unico ad avere una funzione di canale; inoltre, nella famiglia dei canali del Cl^- denominati CLC, coesistono sia canali ionici (CLC-0, CLC-1, CLC-2) che trasportatori (CLC-4 e CLC-5). Infine, nella stessa famiglia, mentre CLC-0, CLC-1, CLC-2 sono canali ionici nei vertebrati, i loro omologhi batterici sono trasportatori.

Caratterizzazione e funzione dei canali ionici

In cellule eccitabili, quali quelle muscolari, endocrine e neuronali, i canali ionici sono responsabili della generazione e regolazione dei segnali elettrici mediante i quali tali cellule comunicano tra loro per garantire una coordinata contrazione del tessuto muscolare, secrezione ormonale e liberazione di neurotrasmettitori; inoltre, in tutte le cellule, essi controllano il volume e la motilità cellulare. Con l'aiuto dei moderni metodi dell'elettrofisiologia e della biologia molecolare, sono stati recentemente identificati numerosi geni che codificano per proteine aventi funzione di canali ionici, e ne sono state caratterizzate le specifiche proprietà funzionali. Oltre a fornire le basi molecolari per l'azione di specifiche classi di farmaci, ciò ha permesso di scoprire che moltissime patologie (oggi globalmente indicate con il nome di "canalopatie") derivano da difetti geneticamente determinati delle proteine-canale (Tabella 22.1).

Per comprendere correttamente il meccanismo d'azione di farmaci che interagiscono con canali ionici, è necessario ricapitolare alcune nozioni relativamente alle proprietà funzionali e strutturali delle proteine-canale.

I canali si differenziano in base allo ione che li permea e al tipo di segnale che ne determina l'apertura

I canali ionici possono essere classificati distinguendoli sulla base di criteri puramente funzionali; due proprietà fondamentali descrivono l'attività di un canale ionico: 1. cosa ne determina l'apertura; e 2. una volta aperto, quale specie ionica attraversa il canale. Tali due processi, temporalmente e (almeno in parte) strutturalmente indipendenti tra loro, delineano, rispettivamente, le proprietà di attivazione o *gating* e di permeazione che consentono di caratterizzare diverse classi di canali ionici.

Nei canali ionici voltaggio-dipendenti (VGICs), il meccanismo di attivazione è innescato da variazioni del voltaggio transmembrana; differenze di anche pochi millivolts possono alterare drasticamente la probabilità di apertura dei canali voltaggio-dipendenti. Altri possibili meccanismi di attivazione dei canali ionici sono le alterazioni della composizione chimica dell'ambiente intra- o extracellulare (canali ionici ligando-dipendenti; vedi Capitolo 12), della forza meccanica applicata (canali meccanosensibili), o della temperatura ambientale (canali termosensibili). Ovviamente, tale distinzione va considerata come un'ipersemplificazione, dal momento che diversi meccanismi concorrono nel regolare l'attivazione dei canali ionici in condizioni fisiopatologiche, come nel caso dei canali del K^+ Ca^{2+} -dipendenti, alcuni dei quali sono anche sensibili alle variazioni del potenziale transmembrana, di canali voltaggio-dipendenti anche sensibili alla pressione osmotica, e di canali ligando-dipendenti che sono influenzabili anche da variazioni del potenziale transmembrana e della temperatura.

Le caratteristiche di permeazione consentono una classificazione dei canali ionici sulla base della loro *selettività ionica* (i canali del Na^+ , del K^+ , del Ca^{2+} , e del Cl^- mostrano il massimo grado di selettività ionica). Ulteriori criteri di classificazione, quali l'espressione celluloso- o tessuto-specifica, o la peculiare sensibilità farmacologica a specifici farmaci o tossine possono contribuire a caratterizzare ulteriormente determinate classi di canali ionici.

Avendo dunque distinto i canali ionici principalmente sulla base delle caratteristiche di permeazione e dei meccanismi di attivazione, vediamo dunque in che cosa consistono queste due proprietà.

I gradienti di concentrazione e il potenziale di membrana impongono agli ioni le regole di permeazione

Per distinguere fra loro diversi canali permeabili allo stesso tipo di ione si usa il concetto di facilità di passaggio degli ioni o conduttanza (γ), che è il rapporto fra la corrente (i) e la forza elettromotrice. Quest'ultima è definita come la somma algebrica dei gradienti elettrici e chimici, perché ogni ione è sempre soggetto alle forze elettriche (potenziale di membrana V_M che è la differenza fra il potenziale citoplasmatico e quello extracellulare) e a quelle diffusionali (prodotte dai gradienti di concentrazione degli ioni nell'ambiente intra- ed extracellulare).

TABELLA 22.1 Principali malattie ereditarie causate da mutazioni in canali ionici (canalopatie)

Malattia	Acronimo	Cromosoma	Canale	Conseguenze patologiche
Convulsioni benigne neonatali familiari	BFNC1	20	KCNQ2	Aumento eccitabilità neuronale, epilessia
	BFNC2	8	KCNQ3	Aumento eccitabilità neuronale, epilessia
Sordità congenita autosomica dominante tipo2	DFNA-2	1	KCNQ4	Sordità
Sindrome del QT lungo				
Malattia di Jervell/Lange-Nielsen (rec.)	LQTS-1	11	KCNQ1	Aritmie cardiache (mutazioni inattivanti)
Malattia di Romano-Ward (dom.)	LQTS-1	11	KCNQ1	Aritmie cardiache e sordità (mutazioni inattivanti)
	LQTS-2	7	KCNH2	Aritmie cardiache (mutazioni inattivanti)
	LQTS-3	3	SCN5A	Aritmie cardiache
	LQTS-5	21	KCNE1	Aritmie cardiache
Sindrome di Andersen-Tawil	LQTS-6	21	KCNE2	Aritmie cardiache
	LQTS-7	17	KCNJ2	Aritmie cardiache (mutazioni inattivanti), paralisi periodiche, e caratteristiche dismorfiche
Sindrome di Timothy	LQTS-8	21	CACNA1C	Aritmie cardiache (mutazioni attivanti)
	LQT-10	11	SCNA4B	Aritmie cardiache
Sindrome di Brugada	BrS	3	SCN5A	Aritmie cardiache
Malattia progressiva della conduzione cardiaca	PCCD	3	SCN5A	Aritmie cardiache con disturbi di conduzione
Sindrome del seno malato	SSS	3	SCN5A	Aritmie cardiache con disturbi di conduzione
Sindrome del QT corto	SQTS	11	KCNQ1	Aritmie cardiache (mutazioni attivanti)
	SQTS	7	KCNH2	Aritmie cardiache (mutazioni attivanti)
	SQTS	17	KCNJ2	Aritmie cardiache (mutazioni attivanti)
	SQTS/BrS	21	CACNA1C	Aritmie cardiache (mutazioni inattivanti)
Bradycardia sinusale familiare	FSB	15	HCN4	Bradycardia sinusale
Disfunzione del nodo senoatriale con sordità	SANND	3	CACNA1D	Aritmie cardiache e sordità
Atassia episodica	EA-1	12	KCNA1	Atassia, emicrania, neurodegenerazione
	EA-2/EA-5	19	CACNA1A	Atassia
Atassia spino-cerebellare	SCA6	19	CACNA1A	Atassia, emicrania
Emicrania emiplegica familiare	FHM1	19	CACNA1A	Emicrania
	FHM3	2	SCN1A	Emicrania
Convulsioni febbrili con epilessia generalizzata	GEFS	2	SCN1A	Convulsioni benigne nell'infanzia
		2	SCN2A	
Sindrome di Dravet	DS	2	SCN1A	Epilessia mioclonica severa dell'infanzia
		2	SCN2A	
Malattia policistica del rene	PKD	16	PDK1	Iperensione, disturbi renali
		4	PDK2/TRPP2	Iperensione, disturbi renali
Paralisi periodica ipokaliemica	HYPOK-PP	1	CaCNAT1S	Paralisi muscolare scheletrica da basso $[K^+]_o$
		17	SCN4A	Paralisi muscolare scheletrica da basso $[K^+]_o$
Paralisi periodica iperkaliemica	HYPERK-PP	17	SCN4A	Paralisi muscolare scheletrica da alto $[K^+]_o$
Paramiotonia congenita	PMC	17	SCN4A	Ipereccitabilità muscolare scheletrica
Miotonia da potassio	PAM	17	SCN4A	Miotonia aggravata da alto $[K^+]_o$
Sindrome miastenica congenita	CMS	17	SCN4A	Miastenia
Eritromelalgia ereditaria	IEM	2	SCN9A	Ipersensibilità al dolore (mutazioni attivanti)
Sindrome del dolore parossistico	PEPD	2	SCN9A	Ipersensibilità al dolore (mutazioni attivanti)
Insensibilità congenita al dolore	CIP	2	SCN9A	Analgesia (mutazioni inattivanti)
Miotonia congenita di Thomsen (dom.) o di Becker (ric.)	TM, BM	7	CLCN1	Miotonia
Ipertermia maligna	MH	19	RYR1	Ipersensibilità a farmaci con attacchi di ipertermia
		1	CACNA1S	
Tachicardia ventricolare polimorfa congenita	CPVT	1	RYR2	Aritmie cardiache
Malattia di Bartter	BD	11	KCNJ1	Alcalosi ipokaliemica
Malattia di Liddle	LD	16	SCNN1B	Iperensione ereditaria; pseudoaldosteronismo
		1	SCNN1D	
Nesidioblastosi	PHHI	11	KCNJ11	Iperinsulinemia infantile (mutazioni inattivanti)
		11	SUR1	Iperinsulinemia infantile (mutazioni inattivanti)
Diabete neonatale persistente	PNDM	11	KCNJ11	Diabete neonatale (mutazioni attivanti); anche SUR1
Diabete neonatale transiente	TNDM	11	KCNJ11	Diabete neonatale (mutazioni attivanti); anche SUR1
Sindrome cardiomiopatica-aritmica	CMDIO	12	SUR2A	Cardiomiopatia dilatativa, aritmie ventricolari
Malattia di Dent	DD	X	CLCN5	Tubulopatia prossimale con insufficienza renale
Osteopetrosi	ADO, ARO	16	CLCN7	Difetti del riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti
Fibrosi cistica	CF	7	CFTR	Alterata secrezione esocrina epiteliale di cloro
Cecità notturna incompleta congenita di tipo2	CSNB2	X	CACNA1F	Visione alterata

L'equilibrio fra queste due forze alle quali sono soggetti gli ioni si chiama potenziale di Nernst (o anche potenziale d'inversione). Il potenziale di Nernst dipende dal logaritmo del rapporto delle concentrazioni dello ione fuori e dentro la cellula secondo la nota equazione $E_{\text{Nernst}} = 60 \times \log ([I^+]_o/[I^+]_i)$, dove $[I^+]_o$ e $[I^+]_i$ sono rispettivamente le concentrazioni extra- e intracellulare dello ione I. Pertanto, in funzione delle concentrazioni intra- ed extracellulari delle diverse specie ioniche, i valori dei potenziali di Nernst per i vari ioni (E_{Na} , E_{K} , E_{Cl} , E_{Ca} ecc.) assumeranno rispettivamente i seguenti valori nella maggior parte delle cellule animali: +70 per E_{Na} , -95 per E_{K} , -30/-60 per E_{Cl} , +150 mV per E_{Ca} . Dunque, l'apertura di una sola specie di canali (ad esempio quella per il K^+) determinerà una corrente (descrivibile dalla seguente forma modificata della legge di Ohm: $i = \gamma \times (V_M - E_{\text{Nernst}})$) che porterà il potenziale cellulare V_M verso il valore di E_{K} , ovvero al valore del potenziale di Nernst per l'unico ione permeante, il K^+ per l'appunto. Poiché, nella maggior parte delle cellule, la conduttanza a riposo per lo ione K^+ è superiore a quella di altre specie ioniche, il V_{REST} assume valori generalmente negativi (fra -40 e -90 mV), prossimi al valore di E_{K} . Quando esistono diversi tipi di canali ionici aperti nello stesso tempo, si stabilisce una situazione di equilibrio che tiene conto di tutte le componenti ioniche; di conseguenza il V_{REST} assume un valore al quale la somma algebrica di tutte le correnti entranti e uscenti è zero. Infine, va ricordato che, per definizione, correnti entranti sono quelle portate da cationi che passano dall'esterno all'interno o da anioni che passano dall'interno verso l'esterno della cellula, laddove le correnti uscenti sono quelle causate dall'uscita di cationi dal citoplasma o dall'influsso di anioni. Pertanto, l'attivazione di correnti entranti determinerà depolarizzazione cellulare, laddove l'attivazione di correnti uscenti causerà iperpolarizzazione cellulare.

Variazioni nel potenziale di membrana regolano il cambiamento conformazionale che attiva il canale voltaggio-dipendente

Il meccanismo che regola l'apertura o la chiusura dei canali voltaggio-dipendenti è il valore di V_M . Sebbene esistano canali ionici la cui probabilità di apertura aumenta

con l'iperpolarizzazione, la maggior parte dei canali ionici voltaggio-dipendenti vengono attivati in seguito alla depolarizzazione della membrana plasmatica. Nelle cellule nervose e muscolari, il V_{REST} è normalmente negativo (circa -60 mV o più negativo). Pertanto, l'attivazione di canali ionici selettivi per Na^+ e Ca^{2+} (normalmente chiusi a livelli di V_{REST} e aperti dalla depolarizzazione) determinerà l'ingresso di cationi e dunque un'ulteriore depolarizzazione cellulare; viceversa, l'attivazione dei canali del K^+ e del Cl^- , determinando un aumento delle correnti uscenti, rappresenta il principale meccanismo con cui le cellule ripolarizzano (o iperpolarizzano) il proprio V_{REST} .

Come descritto nella figura 22.2, in tutti i VGICs la transizione dallo stato chiuso a quello aperto viene definita *attivazione*; viceversa, il processo mediante il quale il canale allo stato aperto riassume la configurazione di chiusura, con conseguente interruzione del flusso ionico, viene definito *deattivazione*. In alcuni canali, oltre allo stato "chiuso" e a quello "aperto", esiste anche uno stato "inattivato" che viene raggiunto attraverso un processo definito di *inattivazione*. Nello stato inattivato, analogamente allo stato chiuso, gli ioni non sono in grado di attraversare il poro del canale; tuttavia, diversamente da quanto avviene nello stato chiuso, il canale nello stato inattivato non può essere riattivato in seguito a una depolarizzazione, ma è necessario che il canale ritorni nello stato chiuso dal quale soltanto potrà essere riaperto. Tale processo, definito *recupero dall'inattivazione*, richiede generalmente che la cellula si ripolarizzi ossia che il suo potenziale ritorni a valori più negativi. Si noti come, sia nel processo di inattivazione che nel recupero dell'inattivazione, il canale possa o meno attraversare lo stato aperto. A tali distinti stati funzionali, corrispondono conformazioni differenti della proteina-canale; ciò ha notevole importanza in farmacologia per comprendere le caratteristiche funzionali di farmaci che interagiscono in maniera diversa con i diversi stati dei canali ionici, ovvero che mostrano azioni stato-dipendenti (vedi oltre). Come già introdotto precedentemente, l'attivazione di un canale ionico non è solo governata da V_M , ma anche altre variabili quali la concentrazione citoplasmatica del Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), del cAMP ($[\text{cAMP}]_i$), di ATP ($[\text{ATP}]_i$), di



FIGURA 22.2 Stati cinetici dei canali ionici. Per ogni tipo di canale ionico e indipendentemente da come viene attivato, possono essere sviluppati particolari modelli cinetici che descrivono l'equilibrio fra i vari stati chiuso-aperto-inattivato a mezzo di costanti (α , β , γ , δ ecc.) che sono funzioni esponenziali di variabili quali V_M , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{cAMP}]_i$, pH_i , e altre.

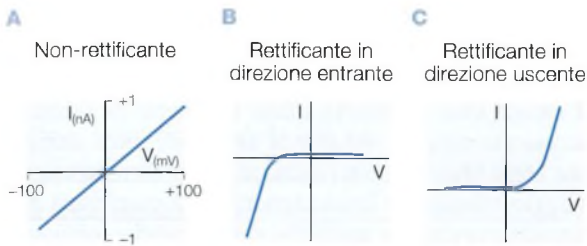


FIGURA 22.3 Relazioni corrente/voltaggio (I/V) dei canali ionici e la rettificazione.

ADP ($[ADP]_i$), di secondi messaggeri, di proteine G. Tali fattori sono a loro volta influenzati dall'attività metabolica cellulare, dal ciclo cellulare e dall'attivazione di recettori per neurotrasmettitori e ormoni. Inoltre, anche legami con le proteine del citoscheletro, oltre a definirne la distribuzione sub-cellulare, possono influenzare l'attività di specifiche classi di canali ionici (vedi Capitolo 13).

Le relazioni corrente-voltaggio dei canali ionici e il processo di rettificazione

Da quanto descritto precedentemente, la versione modificata della legge di Ohm consente di calcolare la dipendenza della corrente misurabile attraverso un canale ionico dalla forza elettromotrice di ciascuno ione che attraversa il canale stesso. Per canali attivati dal voltaggio, tale dipendenza viene spesso determinata sperimentalmente e rappresentata graficamente mediante le relazioni corrente-voltaggio o I/V (Figura 22.3). Ciascuna classe di canali presenta una relazione corrente-voltaggio caratteristica, la cui forma dipende dall'integrazione delle proprietà di permeazione e di attivazione specifiche per ciascun canale; in breve, essa rappresenta spesso la "firma" di un canale. Il pannello A mostra la relazione I/V di un canale ionico la cui conduttanza è costante lungo tutto l'intervallo di valori del potenziale analizzati; in tal caso, una relazione I/V lineare significherà infatti che la conduttanza del canale, calcolata dalla pendenza della retta della relazione I/V , sarà costante. Viceversa, se la conduttanza è variabile a seconda della regione di voltaggio in cui studiamo il canale, si osserveranno delle *rettificazioni*, ovvero delle deviazioni dalla linearità delle relazioni I/V ; due sono le possibili deviazioni dalla legge di Ohm: nei canali *rettificatori entranti* ("inward rectifiers") la conduttanza di membrana è maggiore per potenziali negativi, e tali canali conducono preferenzialmente corrente in direzione entrante (pannello B); viceversa, nei canali *rettificatori uscenti* ("outward rectifiers") avviene il contrario (pannello C).

Organizzazione strutturale dei canali ionici

Grazie agli enormi progressi avvenuti a partire dagli anni 80, che hanno reso possibile la registrazione dei flussi ionici attraverso singoli canali con la tecnica del

"patch-clamp" (vedi CD: Approfondimento 22.1. Come si osservano in tempo reale i canali e le loro correnti), il clonaggio molecolare e quindi la definizione della struttura primaria di una larga parte delle proteine che contribuiscono alla formazione dei canali ionici, e, più recentemente, l'analisi cristallografica di ampie regioni funzionalmente importanti di canali ionici sia voltaggio- che ligando-dipendenti, abbiamo oggi una visione sufficientemente dettagliata, seppure non completa, dell'organizzazione strutturale di molti canali ionici, nonché delle loro relazioni struttura-funzione, ovvero delle regioni coinvolte nel determinismo di specifiche caratteristiche funzionali.

I canali ionici voltaggio-dipendenti sono proteine integrali di membrana a struttura pseudotetramerica

I canali ionici voltaggio-dipendenti sono strutture proteiche il cui peso molecolare complessivo si aggira sui 200-250 kDa. Nel caso del canale al Na^+ e del canale al Ca^{2+} questa struttura consiste di una singola grossa catena polipeptidica (subunità α) organizzata in forma simile a un tetramero (Figura 22.4), in quanto la propria sequenza primaria presenta la ripetizione di 4 regioni omologhe di 300-400 amminoacidi detti domini (I, II, III, IV). Viceversa, nel caso dei canali al K^+ voltaggio-dipendenti, quattro distinti polipeptidi più piccoli, ciascuno corrispondente a uno dei domini presenti nei canali al Na^+ o al Ca^{2+} , si associano per formare un tetramero con lo stesso ruolo funzionale. L'analisi molecolare suggerisce che le subunità monomeriche dei canali al K^+ siano filogeneticamente i precursori dei canali al Na^+ e al Ca^{2+} (Figura 22.4, prima riga). Questa idea è suffragata dalla maggiore eterogeneità genetica (Figura 22.4, riga famiglie) dei canali al K^+ rispetto ai canali al Ca^{2+} (e, a sua volta, dei canali al Ca^{2+} rispetto ai canali al Na^+); infatti, una proteina può presentarsi in configurazioni tanto più eterogenee quanto più lunga è la sua esistenza. L'omologia di sequenza tra i diversi domini è molto alta, ed è a livello di questi domini che esiste il maggior grado di omologia tra i diversi tipi di canali, laddove i segmenti di congiunzione tra i domini sono più divergenti. In tutti i VGICs, ciascun "dominio" (o subunità) contiene 6 segmenti (da S_1 a S_6) che assumono presumibilmente una topologia transmembranaria, formati prevalentemente da amminoacidi idrofobici. La posizione dei singoli segmenti nella struttura tetramerica è tale che i segmenti S_5 ed S_6 si trovano in posizione centrale, mentre gli altri segmenti sono disposti più radialmente. Ognuno di questi segmenti, nonché i tratti di congiunzione tra di essi, svolge un ruolo specifico nelle varie attività del canale come l'attivazione, l'inattivazione o la selettività ionica. Come prima accennato, l'eterogeneità genetica e strutturale dei canali del K^+ è particolarmente elevata; infatti, diversamente da quanto introdotto, strutture molto più piccole, composte unicamente da due segmenti transmembranari, danno origine a canali al K^+ voltaggio-indipendenti (di tipo "inward rectifier", Figura 22.4). Ancora più recentemente, sono stati clonati geni che

codificano per subunità di canali del K⁺ caratterizzate dalla presenza di 2 segmenti transmembranari ripetuti in tandem (4 TM). Il tratto che unisce questi due segmenti transmembranari (sia nelle subunità a 2 TM che a 4 TM) è altamente omologo a quello presente tra i segmenti S₅ ed S₆ dei classici canali del K⁺ voltaggio-dipendenti e, come in questi, contribuisce alla formazione del poro (vedi oltre). D'altra parte, questi canali a 2 o 4 TM mancano del segmento S₄ (il "sensore del voltaggio"), un'osservazione compatibile con il fatto che fisiologicamente tali canali non

sono attivati dalle variazioni del potenziale di membrana. Sia nei canali voltaggio-dipendenti che in quelli voltaggio-indipendenti, oltre alle subunità principali formanti il canale vero e proprio, esiste una serie di subunità accessorie variabili nei diversi canali sia come numero che come tipo, che contribuiscono a un corretto assemblaggio, trasporto e localizzazione nella membrana plasmatica, nonché alle specifiche caratteristiche funzionali e farmacologiche del canale stesso. Sia delle subunità formanti il canale che delle subunità accessorie, esistono

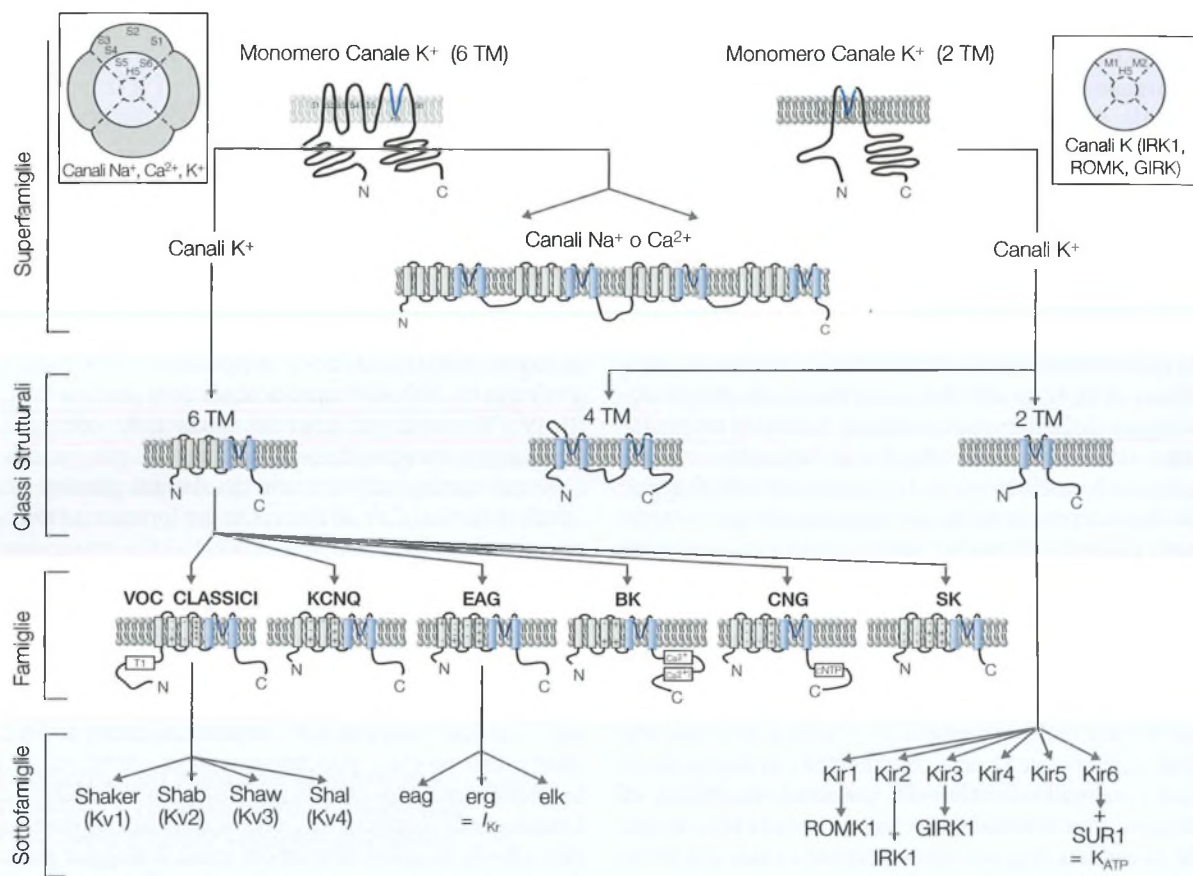


FIGURA 22.4 Schema della struttura e della classificazione gerarchica dei canali ionici. Nella prima e seconda riga sono schematizzate le superfamiglie che costituiscono i canali del Na⁺, del Ca²⁺, e del K⁺. I geni specifici per i canali del Ca²⁺ e del Na⁺ codificano per proteine con 4 domini elementari a 6 TM, ciascuno corrispondente a uno dei domini codificati dai geni per i canali del K⁺. Questi ultimi possono essere costituiti da omo- o etero-tetrameri. I monomeri a 6 TM (detti anche subunità α) a sinistra, e quelli a 2 TM a destra sono rappresentati indicando il dettaglio con il quale la proteina attraversa la membrana e la posizione dei terminali. Nei riquadri rispettivi sono rappresentate la sezione della proteina e la posizione dei singoli segmenti (da S₁ a S₆) nel piano della membrana plasmatica. Nella terza riga è messa in evidenza la diversità strutturale delle classi a 6 TM, 4 TM e 2 TM. Le famiglie a 6 TM (con identità di sequenza amminoacidica fra famiglie dell'ordine del 25-30%) sono rappresentate nella riga quattro con una suddivisione basata su differenze geniche che comportano anche differenze funzionali: i classici canali voltaggio-dipendenti (VOC; K_{v1}, K_{v2}, K_{v3}, e K_{v4}), i canali KCNQ (K_{v7}), i canali EAG (*Ether-A-Go-go*, nome di un mutante di *Drosophila*; K_{v10}, K_{v11}, e K_{v12}), i canali del K⁺ voltaggio- e Ca²⁺-dipendenti ad alta conduttanza o BK (che possiedono un dominio citoplasmatico che ne conferisce la dipendenza da [Ca²⁺]_i), i canali CNG (che hanno al C-terminale un dominio attivabile da nucleotidi ciclici quali cAMP e cGMP), i canali del K⁺ Ca²⁺-dipendenti a bassa conduttanza o SK. Nell'ultima riga si mette in evidenza che esistono numerosissime sottofamiglie (con identità di sequenza amminoacidica dell'ordine di 50-60%, al proprio interno) con nomi vari per lo più provenienti da mutanti di *Drosophila*. I canali della famiglia KCNQ danno origine a due importanti correnti del K⁺ denominate I_{KM} (inibita dall'attivazione del recettore muscarinico) e I_{KS} presenti rispettivamente nei neuroni e nel cuore. Il canali della sottofamiglia ERG sono invece responsabili della corrente I_{Kr} importante nella ripolarizzazione cardiaca ma anche a livello neuronale. Per quanto riguarda i canali della sottofamiglia K_{ir} sono da ricordare il tipo ROMK1 (presente negli epitelii renali), IRK1 (presente prevalentemente nel muscolo scheletrico e cardiaco), GIRK1 (noto per possedere a livello citoplasmatico i siti di legame con le subunità βγ delle G-proteine che ne provocano l'attivazione), e K_{ATP} che rappresenta i canali chiusi dall'aumento della [ATP]; (vedi Figura 22.8).

numerose isoforme (generate da geni diversi e/o da "processamento" alternativo degli stessi geni), variabilmente espresse nei diversi tessuti.

Dove sono strutturate le funzioni voltage-dipendenza, selettività e inattivazione

Voltage-dipendenza

Nei VGICs, lo stimolo per l'apertura del poro è rappresentato da modifiche del potenziale ai lati della membrana plasmatica. Il canale voltage-dipendente deve quindi possedere una struttura transmembranaria in grado di "sentire" il campo elettrico e di modificare la propria conformazione in risposta alle sue variazioni; questa struttura prende il nome di "sensore del voltage". L'esistenza di particelle cariche elettricamente posizionate all'interno del campo elettrico transmembrana la cui dislocazione fosse responsabile dell'attivazione voltage-dipendente della conduttanza era già stata ipotizzata negli anni 50 da Hodgkin e Huxley, che le definirono "cariche di attivazione" ("gating charges"). Quando negli anni 80 vennero definite le sequenze primarie dei primi VGICs (prima quello del Na⁺ neuronale, poi quello del Ca²⁺ dal tessuto muscolare scheletrico, e, infine, quello di *Shaker*, un canale del K⁺ neuronale), si osservò la presenza, nel quarto segmento transmembrana (S₄) di ciascuno dei 4 "domini" omologhi delle subunità α dei canali al Na⁺ e al Ca²⁺ o delle singole subunità del canale al K⁺, di una sequenza amminoacidica caratterizzata dalla presenza di 4-8 residui carichi positivamente (K, lisine; R, arginine) ogni tre posizioni, separati prevalentemente da amminoacidi idrofobici. Venne quindi ipotizzato che tali cariche positive del segmento transmembrana S₄ rappresentassero le principali cariche di attivazione dei VGICs, e che il loro movimento in seguito a variazioni del potenziale transmembrana rappresentasse il *primum movens* dell'attivazione del canale. Le cariche positive in S₄ stabilirebbero legami elettrostatici (ovviamente diversi nella configurazione attivata o di riposo) con residui carichi negativamente (anch'essi altamente conservati tra i diversi VGICs) localizzati nei segmenti S₁, S₂, ed S₃, o con le teste fosfolipidiche della membrana stessa, anch'esse cariche negativamente.

Negli anni successivi, tale ipotesi sperimentale è stata ampiamente testata attraverso i risultati di esperimenti di mutagenesi, spettroscopia in fluorescenza ed elettrofisiologia. Nell'ultimo decennio, grazie principalmente al lavoro di cristallografia di Roderick MacKinnon e del suo gruppo, condotto prima su canali batterici e poi anche di mammifero, è stato possibile elaborare una visione più dettagliata del ruolo dei residui carichi positivamente in S₄ nel processo di attivazione del sensore di voltage; dal momento che gli esperimenti di cristallografia sono condotti in assenza di differenza di potenziale transmembrana, e quindi in uno stato "depolarizzato" della membrana le informazioni strutturali ottenute riguardano soprattutto la configurazione "attivata" del sensore del voltage, laddove meno precise sono quelle relative alla configurazione "a riposo" del sensore. Le attuali controversie si concentrano in

particolare sull'entità e la direzione di tali spostamenti rispetto al campo elettrico transmembrana, nonché sulla posizione del campo elettrico rispetto alla membrana stessa. In linea generale, sono stati proposti tre modelli principali (Figura 22.5A).

- **Modello del trasportatore.** In tale modello, la maggior parte dei residui di arginina dell'S₄ sarebbe posizionata all'interno di cavità polari accessibili all'acqua, in diretta continuità con l'ambiente intra- o extracellulare. In tale modello, l'S₄ andrebbe incontro principalmente a movimenti rotazionali, con una dislocazione lungo il proprio asse di solo 2-4 Å durante la depolarizzazione. Le cariche positive dell'S₄ si muoverebbero da una cavità in continuità con la soluzione intracellulare a una in continuità con l'ambiente extracellulare. In tale modello, il campo elettrico transmembrana sarebbe concentrato in una regione della proteina di soli 5-10 Å, notevolmente più sottile dello spessore della membrana plasmatica (~ 30 Å). Tale modello sottolinea le analogie tra le modifiche strutturali che accompagnano l'attivazione del sensore di voltage dei VGICs e quelle che sono responsabili del trasporto ionico nelle proteine a funzione di trasportatori.
- **Modello "a vite elicoidale".** In tale modello, in posizione di riposo il segmento S₄ carico positivamente sarebbe attratto in prossimità della regione intracellulare della membrana dal potenziale elettrostatico (negativo all'interno); le cariche positive formerebbero dei legami con le cariche negative dei segmenti S₁, S₂ ed S₃. La depolarizzazione della membrana causerebbe la rotazione di S₄ di 60°-180°, insieme alla sua dislocazione di 5-15 Å lungo il proprio asse, per consentire alle prime tre arginine della sequenza primaria di traslocare completamente attraverso il campo elettrico e di formare nuovi contatti elettrostatici con altri residui carichi negativamente.
- **Modello "a paletta".** Questo è basato sulla struttura tridimensionale del canale del K⁺ batterico K_vAP, nel quale è stato osservato che l'S₄ e la parte terminale dell'S₃ (S_{3b}) formano una forcina a elica, definita paletta che presenta ampia libertà di movimento (15-20 Å) attraverso la membrana durante ciascun ciclo di attivazione. La caratteristica fondamentale di questo modello è che le cariche di S₄ sarebbero esposte direttamente ai lipidi sia nello stato di riposo che in quello attivato, mentre negli altri modelli esse si muoverebbero in un ambiente proteico ristretto. Tale modello non sembra essere generalizzabile anche ai canali eucarioti, soprattutto dal momento che questi presentano una lunghezza maggiore del linker tra S_{3b} ed S₄ che renderebbe improbabile la formazione della "paletta".

Infine, va sottolineato come studi recenti abbiano consentito di generalizzare il ruolo di S₄ come sensore di voltage non solo in canali ionici attivati dalla depolarizzazione, ma anche in quelli in cui il flusso di ioni viene innescato da un'iperpolarizzazione della membrana plasmatica, come nei canali HCN (vedi oltre).

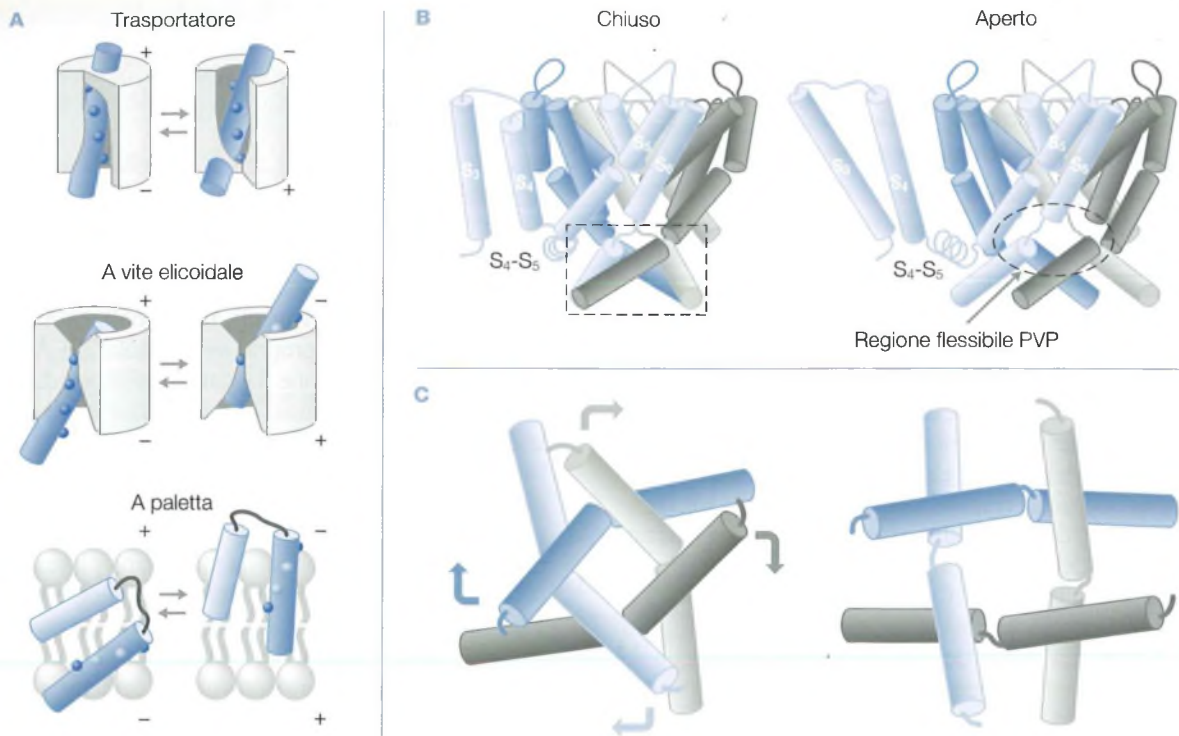


FIGURA 22.5 Modelli di sensibilità al voltaggio dei canali voltaggio-dipendenti. **A.** Modelli di movimento del dominio di sensibilità al voltaggio (*Voltage-Sensing Domain*, VSD). I cilindri blu rappresentano S_4 . Le prime 4 arginine nell' S_4 sono rappresentate come sfere. Per semplicità, queste 4 arginine sono rappresentate sullo stesso lato dell' S_4 . (Da: Tombola F et al. How does voltage open an ion channel? *Ann Rev Cell Dev Biol* 2006;22:23-52, modificata). **B.** Il movimento del VSD viene trasmesso alla regione del poro. Il pannello rappresenta due modelli (stato chiuso a sinistra, stato aperto a destra) del canale $K_v1.2$. Per chiarezza, si mostrano solo il VSD di un'unica subunità e le regioni del poro S_5 - S_6 di tutte e quattro le subunità. La regione indicata nel riquadro a sinistra è ingrandita nel pannello C. **C.** Visione dal lato intracellulare del canale $K_v1.2$, che mette in evidenza solo il movimento della regione C-terminale del segmento S_6 di ciascuna subunità nella transizione dallo stato chiuso allo stato aperto. (Da: Webster SM et al. Intracellular gate opening in Shaker K1 channels defined by high-affinity metal bridges. *Nature* 2004;428:864-8, modificata)

Inattivazione

Come precedentemente accennato, l'attivazione di un canale ionico è spesso seguita dalla sua *inattivazione*. In generale, è possibile distinguere un meccanismo di inattivazione puramente voltaggio-dipendente e un'inattivazione dipendente da ligandi. Le forme di inattivazione voltaggio-dipendenti, che avvengono con cinetiche altamente variabili (da pochi millisecondi a minuti) sono generalmente causate da un riarrangiamento di specifiche porzioni della proteina (regione N-terminale citoplasmatica delle subunità principali dei canali al K^+ , tratto intracellulare di congiunzione tra i "domini" III e IV del canale al Na^+ o tra i "domini" I e II del canale al Ca^{2+}). Queste zone idrofobiche intracellulari rappresenterebbero quindi il "cancello" di inattivazione del canale, che andrebbe a ostruire il poro durante il processo di inattivazione. L'inattivazione ligando-dipendente (ad esempio, quella prodotta dal Ca^{2+} nei canali al Ca^{2+}) è dovuta a complessi meccanismi che coinvolgono l'interazione del canale ionico con proteine Ca^{2+} -leganti come la calmodulina, processi di fosforilazione e defosforilazione, nonché l'interazione tra la subunità principale e le diverse subunità accessorie.

Selettività ionica

Il tratto che congiunge i segmenti transmembranari S_5 ed S_6 contiene una sequenza di una ventina di amminoacidi (chiamata H5 o P), che si insinua al centro dell'anello formato dagli altri segmenti e che forma il contorno della regione centrale del poro attraverso il quale passano gli ioni. A livello di tale regione, si trovano i determinanti molecolari (sequenza GYG, glicina-tirosina-glicina) del *filtro di selettività*, dove avviene la discriminazione tra le diverse specie ioniche. Tale ruolo fondamentale del segmento tra S_5 ed S_6 nella formazione del poro, originariamente dimostrato nel canale al K^+ , è stato successivamente esteso anche al canale al Na^+ e al Ca^{2+} . Anche il segmento di connessione tra il segmento S_4 e l' S_5 , la porzione distale dell' S_6 e, nei canali del K^+ a 2 segmenti TM (vedi oltre), diverse regioni dell'estremità C-terminale partecipano a delimitare la via di conduzione degli ioni attraverso il canale ionico.

In condizioni di riposo, il poro è chiuso per impedire il flusso ionico; viceversa, quando il sensore di voltaggio si trova in condizione permissiva di attivazione, il poro può aprirsi. Durante la depolarizzazione, il riarrangiamento conformazionale di S_4 , attraverso la regione di

connessione tra i segmenti S_4 ed S_5 , verrebbe trasmesso al segmento transmembrana S_6 di una subunità contigua, determinando poi l'apertura del poro (Figura 22.5B e C). Informazioni cristallografiche recentemente ottenute in molti canali del K^+ di mammifero hanno dimostrato che le cerniere che governano l'apertura e chiusura del poro sono localizzate a livello della regione C-terminale dei segmenti transmembrana S_6 ; in tale regione, una sequenza amminoacidica PVP (prolina-valina-prolina) di ciascuna subunità (o dominio) crea un fascio di 4 eliche flessibili che si dislocano perifericamente durante l'apertura del poro e si ricompattano durante la sua chiusura, interrompendo il flusso ionico. Nei canali batterici, nei quali manca la sequenza caratteristica PVP, tale funzione di cerniera viene invece svolta da un residuo di glicina localizzato in posizione omologa. Differenze nell'ampiezza del movimento di queste regioni distali di S_6 spiegherebbero anche le differenze di conduttanza di singolo canale riscontrate tra i canali batterici e quelli eucarioti; infatti, i movimenti sembrano più ampi nei canali batterici (che hanno una conduttanza molto più elevata) rispetto a quelli eucarioti, che hanno una conduttanza circa dieci volte inferiore. Pertanto, i contatti diretti tra il segmento di connessione S_4 - S_5 e la regione C-terminale dell' S_6 di subunità contigue sembrano garantire l'accoppiamento elettromeccanico tra la dislocazione del sensore del voltaggio e l'apertura del poro.

Farmaci e canali ionici

Il chiarimento delle specifiche proprietà farmacologiche di ciascuna classe di canali ionici rappresenta una tappa di fondamentale importanza per la medicina moderna, dal momento che il 5% di tutte le terapie farmacologiche attualmente disponibili per il trattamento di patologie umane utilizza farmaci che riconoscono come bersaglio diretto un canale ionico. Ciò diventa ancora più evidente se si considera che recettori ed enzimi nell'insieme rappresentano oltre il 70% di tutti i bersagli farmacologici, e che l'azione terapeutica che risulta dalla modifica della funzione di tali proteine è spesso riconducibile in maniera indiretta all'alterata funzione di specifici canali ionici da essi controllati. Pertanto, la caratterizzazione della sensibilità farmacologica e delle proprietà di modulazione di specifici canali ionici ha un ruolo importante per comprendere gli attuali approcci terapeutici, nonché le strategie d'intervento innovative che vedono nei canali ionici il loro bersaglio molecolare.

Numerosi farmaci agiscono per interazione diretta con i canali ionici

Molte classi di farmaci, sia di origine naturale che sintetici o semisintetici, esplicano la propria attività terapeutica in seguito a interazione diretta con canali ionici (Tabella 22.2 e vedi CD: Approfondimento 22.2. Modalità di valutazione dell'interazione tra farmaci e canali ionici). Alcuni di essi interagiscono specificamente con canali al Na^+ (anestetici locali, anticonvulsivanti, parte degli antiaritmici

TABELLA 22.2 Principali classi di farmaci attivi sui canali ionici

Bloccanti dei canali al Na^+	Voltaggio-dipendenti
	Anestetici locali (bupivacaina, cocaina, lidocaina, mepivacaina, tetracaina)
	Anticonvulsivanti (carbamazepina, fenitoina, valproato, lamotrigina, oxcarbazepina, eliscarbazepina)
	Antiaritmici di classe I: – IA (disopiramide, procainamide, chinidina) – IB (lidocaina, mexiletina, fenitoina, tocainide) – IC (encainide, flecainide, propafenone)
	Miorilassanti (mexiletina, tocainide)
	Non voltaggio-dipendenti
	Diuretici (amiloride)
Bloccanti dei canali al Ca^{2+}	Antianginosi (diltiazem, amlodipina, verapamil)
	Antipertensivi (amlodipina, felodipina, isradipina, nifedipina, diltiazem, verapamil)
	Antiaritmici di classe IV (diltiazem, verapamil)
	Analgesici (ziconotide)
	Antiepilettici (etosuccimide)
Bloccanti dei canali al K^+	Antiaritmici di classe III (amiodarone, dofetilide, N-acetilprocainamide, sotalolo)
	Facilitatori della conduzione nervosa (4-aminopiridina, 3,4-diaminopiridina)
	Antidiabetici (glipizide, gliburide, tolazamide; nateglinide, mitiglinide)
Attivatori dei canali al K^+	Antipertensivi (diazossido, cromakalim)
	Anticonvulsivanti (retigabina, flupirtina)
	Anestetici generali (alotano, isoflurano)
Bloccanti dei canali non-selettivi (I_1)	Antianginosi, antischemici, bradicardizzanti (ivabradina, zetabradina)

e dei diuretici); altri con canali al Ca^{2+} (antipertensivi, antianginosi, altri antiaritmici); altri ancora con canali al K^+ (altri antiaritmici, ipoglicemizzanti orali e alcuni vasodilatatori). Tali farmaci verranno descritti in maggiore dettaglio nell'ambito dei paragrafi specificamente dedicati a ciascun canale ionico.

Altri farmaci agiscono su recettori funzionalmente accoppiati ai canali ionici e ne modulano l'attività

Molti agenti terapeutici sono agonisti o antagonisti di recettori metabotropici per ormoni e neurotrasmettitori. Agonisti di tali recettori avviano ulteriori processi biochimici intracellulari (attivazione di G proteine, modulazione di enzimi come ciclastasi o fosfolipasi, generazione di secondi messaggeri quali cAMP, cGMP, IP_3 , diacilglicerolo, acido arachidonico e Ca^{2+} , attivazione di chinasi e fosfatasi) che possono provocare, tra le altre cose, modulazione delle conduttanze ioniche di membrana. Alla luce di questo stretto accoppiamento funzionale tra recettori e canali ionici, è evidente come l'effetto di questi farmaci possa in larga misura essere

dovuto a modulazione dell'attività di canali ionici. I meccanismi di modulazione possono essere più o meno diretti, coinvolgendo un singolo evento (ad esempio, l'attivazione di una G proteina che attiva direttamente un canale), oppure un'intera cascata di eventi biochimici intracellulari, rispondendo a esigenze differenti di rapidità e di articolazione del programma di modulazione. La modulazione dei canali ionici a opera di recettori per ormoni o neurotrasmettitori è alla base di fondamentali processi di regolazione dell'attività cellulare, come la regolazione simpatica e parasimpatica dell'attività cardiaca, la modulazione del rilascio dei neurotrasmettitori e della contrattilità muscolare, la secrezione degli ormoni. Un esempio classico è rappresentato dalla modulazione autonoma del canale del Ca^{2+} di tipo L delle cellule muscolari cardiache. La stimolazione del recettore β -adrenergico attiva una specifica G proteina (G_s), che può modulare i canali L in due modi complementari: uno più rapido, interagendo direttamente con il canale, e uno più lento, attivando l'adenilato ciclasi, la sintesi di cAMP, l'attivazione della proteinchinasi A, e infine la fosforilazione del canale stesso. Entrambe queste forme di modulazione provocano un'aumentata probabilità di apertura del canale L e, di conseguenza, maggiore influsso di Ca^{2+} e inotropismo cardiaco. Per contro, parte dell'azione cronotropa, dromotropa, e inotropa negativa dell'acetilcolina è legata all'attivazione, proteina G_i -dipendente, di un canale rettificatore entrante al K^+ nelle cellule del nodo seno-atriale e nei miociti atriali. Legandosi al recettore muscarinico, l'acetilcolina attiva G_i provocandone la dissociazione in subunità α e $\beta\gamma$: queste ultime si legano a un'apposita sequenza di riconoscimento sul canale causandone l'apertura.

Canali al sodio

I canali al sodio voltaggio-dipendenti sono responsabili della fase di depolarizzazione del potenziale d'azione

La rapidità della fase di ascesa del potenziale d'azione delle cellule eccitabili è garantita non solo dall'alto valore della costante di reazione (dipendente dal voltaggio) dell'istantaneo cambiamento conformazionale della proteina dallo stato chiuso a quello aperto, ma anche dalla immediata depolarizzazione prodotta dalle correnti di Na^+ . Questo meccanismo, rigenerativo e inarrestabile fino al picco del potenziale d'azione, rappresenta la base dell'eccitabilità cellulare ed è favorito dall'alta densità locale delle proteine-canale presenti sulla membrana. Ogni alterazione di questa fenomenologia è capace di causare gravi patologie, anche di natura genetica (Tabella 22.1), che possono interessare i canali del sodio cardiaci, muscolari scheletrici, o neuronali.

Organizzazione molecolare e modulazione

I canali al Na^+ voltaggio-dipendenti, con quelli al Ca^{2+} , sono composti da una singola catena polipeptidica formante il canale ionico vero e proprio (subunità α), corredata di subunità accessorie β (Figura 22.6A). La subunità α del canale al Na^+ dell'organo elettrico di torpedine è stato il primo canale voltaggio-dipendente purificato e poi clonato all'inizio degli anni 80; essa contiene tutti i siti di legame per farmaci e tossine finora noti e inoltre siti di glicosilazione, a livello della zona extracellulare tra S_5 ed S_6 dei "domini" I e II, e di fosforilazione, nel segmento di connessione tra i domini I e II, e nelle regioni NH_2 - e COOH -terminali.

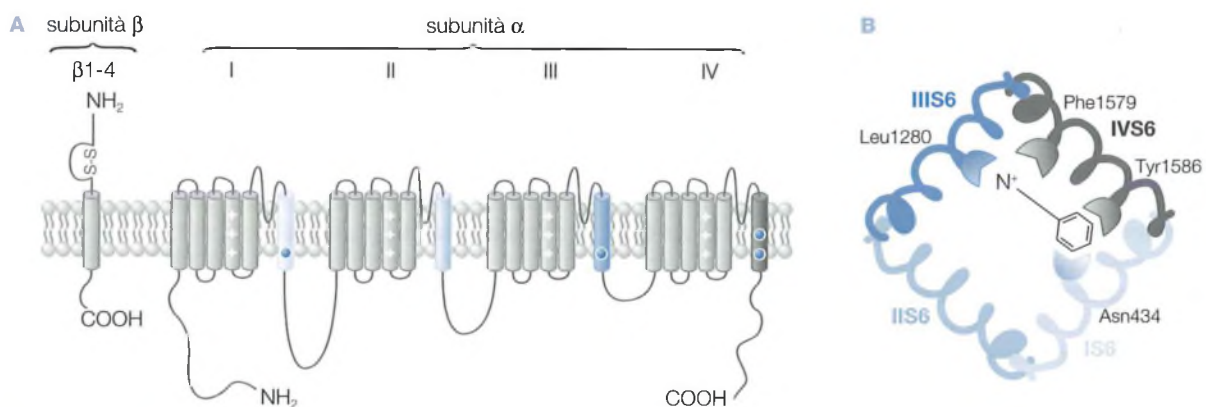


FIGURA 22.6 Topologia di membrana dei canali del Na^+ voltaggio-dipendenti. **A.** I segmenti transmembrana sono mostrati come cilindri. La subunità principale α include quattro domini (indicati con I-IV), ciascuno con sei segmenti transmembrana. Le subunità β hanno un unico segmento transmembrana, una breve regione intracellulare, e un'ansa extracellulare analoga ai domini immunoglobulinici; le subunità $\beta 1$ e $\beta 3$ presentano interazioni non-covalenti con le subunità α , laddove $\beta 2$ e $\beta 4$ sono legati a esse covalentemente. Studi di mutagenesi hanno identificato i residui (indicati con pallini blu) nei segmenti transmembrana IS_6 , IIS_6 , e IVS_6 , che sono importanti per il legame degli anestetici locali e degli antiepilettici che bloccano i canali del sodio. **B.** La struttura tipica di un bloccante dei canali del sodio consiste di una regione carica positivamente (un gruppo amminico) da un lato e di un gruppo aromatico dall'altro. Studi di modellistica molecolare suggeriscono che il gruppo amminico carico positivamente interagisce con un residuo di fenilalanina nel dominio IV (Phe1579 nel $\text{Na}_v1.4$) e con una leucina nel dominio III (Leu1280 nel $\text{Na}_v1.4$), mentre il gruppo aromatico interagirebbe con una tirosina nel dominio IV (Tyr1586) e un'asparagina nel dominio I (Asn434). (Da: Mantegazza M, Curia G, Biagini G et al. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 2010;9:413-24, modificata)

Entrambe queste modificazioni post-traduzionali influenzano la stabilità del canale nella membrana e ne modulano l'attività. In particolare, la fosforilazione via proteinchinasi cAMP-dipendente causa riduzione del flusso ionico nel canale sia a livello cerebrale che cardiaco, mentre la fosforilazione via PKC, oltre a ridurre il flusso ionico, rallenta la velocità di inattivazione del canale nelle cellule nervose. Anche l'attivazione di specifiche tirosinchinasi sembra modulare la funzione dei canali del sodio voltaggio-dipendenti; inoltre, sia a livello cardiaco che neuronale, il canale sarebbe anche modulato da G proteine (G_s), mediante interazione diretta con le subunità $\beta\gamma$ di queste. Nei mammiferi la subunità α è associata a una o due subunità β più piccole (35-38 kDa), che sembrano assolvere un ruolo di modulazione dell'espressione e/o attività di α , nonché di regolazione delle interazioni intercellulari tra neuroni e cellule gliali. Tali subunità β sono costituite da un singolo segmento transmembranario, un lungo tratto glicosilato extracellulare avente una caratteristica struttura analoga a domini simil-immunoglobulinici, e una piccola coda citoplasmatica. Diverse isoforme di subunità α sono presenti a seconda della specie e del tessuto (Tabella 22.3). A livello cerebrale sono stati inizialmente descritti tre geni codificanti subunità α (I, II e III, oggi denominati SCN1A, 2A e 3A; SCN = *Sodium ChanNel*). Alcune di queste isoforme di canali al Na^+ , sia neuronali ($Na_v1.8$, $Na_v1.9$), che prevalentemente muscolari cardiache ($Na_v1.5$), sono caratterizzate dalla minore sensibilità all'azione inibitoria della tetrodotossina (TTX).

■ Localizzazione dei canali del sodio

Lo studio dell'espressione dei prodotti genici che codificano per canali ionici a livello dei vari tessuti conferma che, seppure la presenza di canali sia ubiquitaria, ogni cellula possiede un corredo di canali specifici, che ne determinano diverse proprietà funzionali. Inoltre, una cellula spesso possiede più domini funzionali, ognuno dei quali esprime una propria popolazione specifica di canali ionici. Nei neuroni, alcuni canali sono concentrati nelle terminazioni presinaptiche, altri nelle densità postsinaptiche, altri ancora nella regione somatodendritica o negli assoni. Se è vero che i vari canali sono piuttosto omologhi nelle sequenze responsabili di selettività ionica, voltaggio-dipendenza e inattivazione, è anche vero che essi hanno tratti più divergenti dove si trovano siti di ancoraggio al citoscheletro o di interazione con altre proteine, che conferiscono specificità di localizzazione.

Ad esempio, i canali al Na^+ neuronali sono particolarmente concentrati nel segmento iniziale dell'assone dove viene a determinarsi una zona a più bassa soglia per lo scatenamento del potenziale d'azione. Lungo l'assone, pochissimi sono i canali nella membrana internodale, mentre è alta la loro densità a livello dei nodi di Ranvier (2000 canali/ μm^2), determinando il fenomeno della conduzione saltatoria del potenziale d'azione. D'altronde, a livello dei nodi, sono presenti cellule gliali ben precise (oligodendrociti o cellule di Schwann). È stato recentemente dimostrato come la subunità β esprima

alla regione amminotermine extracellulare una sequenza simil-immunoglobulinica tipica delle proteine di adesione. È stato quindi ipotizzato che sia una molecola di adesione cellulare presente sulle cellule gliali a indirizzare il canale Na^+ (attraverso la sua subunità β) al nodo di Ranvier utilizzando una via prettamente extracellulare. Recenti evidenze suggeriscono inoltre che la peculiare localizzazione nodale di alcuni canali voltaggio-dipendenti al sodio richiede anche un'interazione diretta tra la subunità principale α e proteine di ancoraggio al citoscheletro, quali l'ankirina G. Anche a livello del muscolo scheletrico, i canali al Na^+ sono concentrati nella zona dove deve generarsi il potenziale d'azione. La depolarizzazione locale indotta dall'apertura dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (concentrati alla sommità delle invaginazioni postsinaptiche) viene sentita dai canali al Na^+ (concentrati nella profondità delle invaginazioni stesse), che generano un potenziale d'azione e lo trasmettono lungo tutta la membrana fino alle triadi.

■ Farmaci e canali del sodio

La farmacologia dei canali del sodio voltaggio-dipendenti inizia ben prima che fossero delineate le molteplici funzioni in cui essi sono implicati o che venisse riconosciuta la loro eterogeneità genetica e strutturale. In tale ambito, la farmacologia dei canali del sodio costituisce un esempio paradigmatico di come l'utilizzo a fini terapeutici di alcuni farmaci abbia facilitato la comprensione dei processi fisiopatologici la cui modifica è responsabile dell'azione farmacologica. Infatti, successivamente alla scoperta delle potenti azioni anestetiche locali della cocaina alla fine dell'800, la ricerca di derivati sintetici della cocaina che fossero sprovvisti di proprietà tossicomane, portò alla sintesi della procaina nel 1905. Negli anni a seguire, per ovviare alla breve durata d'azione della procaina, venne introdotta la lidocaina, capostipite della classe degli anestetici locali a struttura amidica. Sebbene le proprietà cardiovascolari di più vecchie molecole a uso anestetico fossero all'epoca già note, la sintesi della lidocaina, avvenuta alla fine degli anni 40, ha rappresentato il punto di divergenza tra le famiglie di farmaci ad attività anestetico-locale e quelle ad attività antiaritmica. D'altra parte, tale "filo conduttore" si interseca anche con molecole ad attività anticonvulsivante, se si pensa che la fenitoina, sintetizzata con l'obiettivo di sopprimere l'attività parossistica di neuroni coinvolti in molte manifestazioni epilettiche senza causare la sedazione caratteristica dei barbiturici, ha rappresentato e rappresenta tutt'oggi un valido farmaco antiaritmico. Da tale breve digressione storica, non appare dunque sorprendente come farmaci dotati di indicazioni terapeutiche distinte, riconoscano un meccanismo d'azione comune, la cui scoperta è iniziata solo molti anni dopo la loro sintesi e introduzione a uso terapeutico: il blocco dei canali del Na^+ voltaggio-dipendenti nelle membrane di cellule eccitabili. Come già descritto, le più importanti classi di farmaci dotati di tale proprietà sono:

- gli anestetici locali, che bloccano i canali al Na^+ dei nervi periferici;

TABELLA 22.3 Classificazione e farmacologia dei canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti

Sottofamiglie (altri nomi)	Na _v 1.1 (SCN1A)	Na _v 1.2 (SCN2A)	Na _v 1.3 (SCN3A)	Na _v 1.4 (μ1; skMI; SCN4A)
Cromosoma	2q23-24	2q23-24	2q23-24	17q23-25
Tessuto	SNC, SNP	SNC	SNC	Muscolo scheletrico
Bloccanti (IC ₅₀)	TTX (6 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (13 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (4 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (5 nM), lidocaina, μ-GIIIA, μ-PIIIA
Attivatori	Veratridina, β-tossine	Veratridina, β-tossine	Veratridina, β-tossine	Veratridina, β-tossine
Inibitori inattivazione	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine
Fisiologia	Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, firing, up-regolato nel danno neuronale	Potenziale d'azione, firing
Farmacologia, bersaglio	Antiepilettici	Antiepilettici	Antiepilettici	Antiepilettici
Canalopatie	GEFS+; FHM3	GEFS+	-	HPPP, PMC, PAM

ATXII: tossina di anemone di mare; α-tossine: tossine di scorpione di tipo alfa; β-tossine: tossine di scorpioni di tipo β; DRG: gangli sensitivi spinali; μ-GIIIA, μ-PIIIA: tossine di conchiglie di mare; TTX (60 μM): tetrodotossina (IC₅₀); GEFS+: convulsioni febbrili con epilessia generalizzata +; FHM3: emicrania emiplegica familiare tipo3; HPPP: paralisi periodica ipercalemica; PMC: paramiotonia congenita; PAM: miotonia da potassio

- ▶ gli antiaritmici di classe I, che bloccano i canali al Na⁺ cardiaci;
- ▶ gli anticonvulsivanti, che bloccano i canali al Na⁺ dei neuroni centrali;
- ▶ i miorilassanti o antimiotonici, che bloccano i canali del Na⁺ del muscolo scheletrico.

Nonostante tale comune meccanismo d'azione, ragioni di natura sia farmacocinetica (ad esempio modalità di somministrazione) che farmacodinamica (ad esempio, maggiore selettività per un canale del Na⁺ rispetto a un altro) rendono ragione dell'appartenenza di ciascuna molecola a una specifica classe terapeutica. Le modalità dell'interazione di tali farmaci con i canali del Na⁺, nonché i determinanti strutturali necessari per il blocco del canale, sono oggi relativamente ben chiarite (Figura 22.6B).

L'interazione dei bloccanti dei canali al sodio con il loro sito recettoriale è frequenza- e voltaggio-dipendente

Come prima sottolineato, i canali del Na⁺ vanno incontro a un processo sequenziale di attivazione, inattivazione e recupero dall'inattivazione. A ciascuna di tale fase funzionale, corrisponde una conformazione distinta della proteina canale. Una delle caratteristiche peculiari del blocco del canale del Na⁺ da parte degli anestetici locali è la loro uso-dipendenza (o blocco "fasico"); infatti, in presenza dell'anestetico locale, il blocco delle correnti di Na⁺ aumenta all'aumentare della frequenza di stimolazione del nervo. Ciò è dovuto al fatto che il farmaco (soprattutto se dotato di carica) accede rapidamente al suo sito di legame all'interno della bocca del canale soltanto quando il canale è nello stato "attivato" (aperto) e ha poi alta affinità di legame per lo stato "inattivato". Esso dunque si lega (e blocca

così il canale) in maniera cumulativa e progressiva in piccoli incrementi corrispondenti alle volte in cui il canale si apre. Dunque, la frequenza con cui il canale viene stimolato ad aprirsi determina la rapidità con cui la progressione di blocco arriva al suo livello massimale. La voltaggio-dipendenza è conseguente alla caratteristica di blocco uso-dipendente, in quanto l'attivazione del canale al Na⁺, e quindi la sua esistenza nello stato aperto, è regolata dal voltaggio. Queste importanti proprietà fanno sì che gli antiaritmici di classe I agiscano preferenzialmente su cellule cardiache danneggiate (e quindi depolarizzate) senza alterare le normali proprietà elettriche del cuore, che gli anticonvulsivanti bloccano le scariche epilettiche senza prevenire la normale attività neuronale e senza avere maggiori effetti sedativi, e che gli anestetici locali bloccano preferenzialmente le fibre nervose dotate di più elevata frequenza di scarica, quali quelle che veicolano la sensibilità dolorifica, dal momento che queste sono non- o scarsamente mielinizzate e hanno calibro relativamente piccolo. Il fatto che distinte configurazioni del canale ionico possano presentare una sensibilità farmacologica molto diversa tra loro, oltre alle descritte conseguenze per l'uso terapeutico di farmaci uso-dipendenti, sottolinea l'elevato grado di dinamismo strutturale di tali proteine.

Indicazioni cardiovascolari dei farmaci bloccanti dei canali del Na⁺

Il blocco del canale del sodio rappresenta uno dei meccanismi farmacologici per esercitare azioni antiaritmiche. Infatti, il blocco dei canali del sodio può interrompere le aritmie da rientro, bloccare le extrasistoli da post-depolarizzazioni tardive, nonché accorciare il potenziale d'azione e prevenire le post-depolarizzazioni precoci. I bloccanti dei canali del Na⁺ riducono la velocità di contrazione, l'eccitabilità e la conduzione del miocardio.

Na _v 1.5 (h1; skIII; SCN5A)	Na _v 1.6 (NaCh6; PN4; SCN8A)	Na _v 1.7 (PN1; SCN9A)	Na _v 1.8 (SNS; PN3; SCN10A)	Na _v 1.9 (NaN; SNS-2; SCN11A)
3p21	12q13	2q24	3p21-24	3p21-24
Cuore, muscolo embrionale, SNC (sistema limbico)	Cervelletto, nodi di Ranvier, DRG	SNP, DRG, cromaffini, Schwann	Neuroni DRG a piccolo diametro	Neuroni DRG a piccolo diametro
TTX (2 μM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (1 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (2 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (>100 μM)	TTX (40 μM)
Veratridina, β-tossine	Veratridina, β-tossine	Veratridina, β-tossine	–	–
ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	–	–
Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, nocicezione	Nocicezione
Antiaritmici	Antiepilettici	Anestetici locali, carbamazepina	–	Analgesici
LaTs-3, BrS, PCCD, SSS	Atrofia cerebellare, disturbi del comportamento, e atassia	IEM, PEPD, CIP	–	–

LaTs-3: long QT sindrome tipo 3; BrS: sindrome di Brugada; PCCD: malattia progressiva della conduzione cardiaca; SSS: sindrome del seno malato; IEM: eritromelalgia ereditaria; PEPD: sindrome del dolore parossistico; CIP: canalopatia da insensibilità congenita al dolore.

La classificazione dei farmaci antiaritmici comunemente usata è riportata nella tabella 22.4. La distinzione in tre sottoclassi della classe dei bloccanti dei canali del Na⁺ (IA, IB, IC) è basata principalmente sugli effetti di tali farmaci sulla durata del potenziale d'azione, cui contribuiscono, insieme ad altri fattori, le cinetiche e la stato-dipendenza dell'interazione di ciascuna molecola con il canale del Na⁺ cardiaco, oltre che la capacità di ciascun farmaco di bloccare anche altri canali ionici cardiaci. Infatti, sebbene tutti gli antiaritmici di classe I mostrino una marcata uso-dipendenza, i farmaci di classe IA (chinidina, procainamide, disopiramide) e IC (flecainide, encainide, propafenone) si dissociano lentamente dal

canale del Na⁺ durante la diastole (>2 secondi), pertanto deprimono le correnti di Na⁺ anche nel miocardio a frequenza normale. Viceversa, le molecole di classe IB (lidocaina, mexiletina, tocainide, fenitoina), avendo una velocità di recupero tra 0,5 e 1 secondo, inibiscono la conduzione cardiaca solo a frequenze elevate, un fattore che potrebbe spiegare il fatto che le molecole di gruppo IB mostrano minori effetti pro-aritmici e inotropi negativi rispetto alle altre molecole di gruppo I. Il prolungamento della durata del potenziale d'azione cardiaco prodotto dalle molecole della classe IA è probabilmente conseguente al blocco di canali del K⁺ responsabili della ripolarizzazione miocardica.

TABELLA 22.4 Classificazione dei farmaci antiaritmici secondo Vaughan-Williams

Classe	Meccanismo d'azione	Esempi
I.	Bloccanti del canale al Na⁺	
IA	Blocco moderato-marcatto dei canali al Na ⁺ ; velocità di dissociazione intermedia dal canale del Na ⁺ ; prolungamento della durata del potenziale d'azione per blocco anche di diversi tipi di canali al K ⁺	Chinidina, procainamide, disopiramide
IB	Blocco moderato-leggero dei canali al Na ⁺ ; rapida dissociazione dal canale del Na ⁺ ; scarso effetto sulla durata del potenziale d'azione e sullo stato refrattario per assenza di blocco dei canali al K ⁺	Lidocaina, fenitoina, mexiletina, tocainide
IC	Blocco marcato dei canali al Na ⁺ ; lenta dissociazione dal canale del Na ⁺ ; scarsi effetti sulla durata del potenziale d'azione, ma marcata depressione della velocità di ascesa del PDA (V _{max}) e prolungamento dello stato refrattario	Encainide, flecainide, propafenone, moricizina
II.	Bloccanti β-adrenergici Blocco indiretto dei canali al Ca ²⁺ per riduzione della stimolazione adrenergica	Propranololo, metoprololo, atenololo, esmololo, acebutololo, timololo, betaxololo, carvedilolo, nadololo...
III.	Bloccanti dei canali al K⁺ Prolungamento dello stato refrattario e rallentamento della ripolarizzazione, con conseguente allungamento della durata del potenziale d'azione (intervallo QT); pochi effetti diretti sui canali al Na ⁺	Dofetilide, ibutilide, tedisamil, amiodarone, dronedarone, sotalolo, azimilide, bretillo
IV.	Bloccanti dei canali al Ca²⁺ Inibizione delle cellule "pace-maker" del nodo seno-atriale e della conduzione atrio-ventricolare per blocco diretto dei canali al Ca ²⁺	Verapamil, diltiazem, mibefradil

Va inoltre sottolineato che farmaci attivatori dei canali voltaggio-dipendenti del Na^+ a livello cardiaco esercitano un importante effetto inotropo positivo, che potrebbe in futuro essere sfruttato per il trattamento dello scompenso cardiaco congestizio.

Indicazioni anestesiolgiche dei farmaci bloccanti dei canali del Na^+

Farmaci bloccanti dei canali del Na^+ quali la bupivacaina, la lidocaina, la mepivacaina, la tetracaina (oltre a molti altri), sono largamente utilizzati in procedure di *anestesia locale*. I recenti sviluppi hanno tentato di migliorare l'efficacia e soprattutto la tollerabilità di tali farmaci, introducendo molecole dotate di minori effetti neurotossici e, soprattutto, cardiotossici diretti (effetti cronotropi, dromotropi e inotropi negativi). È stato infatti dimostrato che gli effetti dromotropi negativi mostrano un elevato grado di stereoselettività: gli isomeri S-(-) degli anestetici locali a lunga durata d'azione causavano effetti meno marcati delle relative misture racemiche. Inoltre, negli ultimi anni, i canali al Na^+ hanno ricevuto una notevole attenzione come bersaglio di farmaci analgesici da utilizzare per il trattamento del *dolore neuropatico* periferico associato con l'ipereccitabilità delle fibre afferenti primarie. Tali nuove linee di ricerca sono state anche aperte dall'osservazione che isoforme specifiche di canali al Na^+ sono espresse a livello dei gangli delle radici dorsali (Tabella 22.3) e che la loro espressione è modulata dal dolore; farmaci selettivamente in grado di bloccare tali isoforme periferiche di canali del Na^+ sarebbero sprovvisti di azioni avverse a livello del SNC o cardiovascolare.

Indicazioni neurologiche dei farmaci bloccanti dei canali del Na^+

Epilessia

Le convulsioni epilettiche sono caratterizzate da scariche ad alta frequenza di potenziali d'azione, che determinano un'attività sincrona di popolazioni neuronali cerebrali. Al momento attuale, nessuno dei farmaci antiepilettici clinicamente utili riconosce un'azione terapeutica interamente riconducibile al blocco di un tipo (o una classe) di canali ionici; tuttavia, dati sperimentali degli ultimi 15-20 anni hanno dimostrato come il canale del Na^+ sia un bersaglio di importanza primaria per farmaci antiepilettici sia più datati, quali la fenitoina e la carbamazepina, che di più recente introduzione, quali la lamotrigina, l'oxcarbazepina e il felbamato. Dati ancora non definitivi sono stati ottenuti con l'acido valproico e il topiramato. La gran parte di tali farmaci produce un blocco dalle analoghe caratteristiche: 1. il blocco è più intenso a potenziali depolarizzanti; 2. il recupero dall'inattivazione è fortemente prolungato, per cui la disponibilità dei canali del Na^+ in condizioni di alta attività funzionale è fortemente ridotta. Come prima accennato, tale proprietà generale rende ragione del fatto che tali farmaci blocchino stati di ipereccitabilità senza alterare il normale funzionamento neuronale.

Malattie muscolari

La miotonia è una malattia muscolare scheletrica, sia geneticamente determinata (Tabella 22.1) che acquisita, caratterizzata da contrazioni prolungate causate da un ritardato miorelaxamento delle fibre muscolari scheletriche. Farmaci antiaritmici bloccanti dei canali del Na^+ , quali la mexiletina (un derivato della lidocaina attivo per via orale) e la tocainide, sono anche utilizzati come farmaci antimiotonici. Inoltre, la mexiletina è estremamente efficace nel controllare gli attacchi di paralisi muscolare indotta dal freddo in pazienti affetti da paramiotonia congenita. È evidente come lo sviluppo di farmaci dotati di maggiore selettività per il canale del Na^+ muscolare scheletrico sia di grande interesse per il trattamento di tali patologie muscolari.

Neuroprotezione

Le analogie tra i meccanismi neurochimici che sostengono a livello cellulare e molecolare le manifestazioni epilettiche e quelle implicate in fenomeni neurodegenerativi, e in particolare il coinvolgimento di disregolazioni dell'attività dei canali del Na^+ e del Ca^{2+} in entrambi tali disturbi neurologici, ha posto le basi razionali per la sperimentazione di agenti bloccanti dei canali del Na^+ in situazioni di insulti acuti quali l'ischemia cerebrale o i traumi cranici e spinali. Infatti, sia farmaci anestetici locali, quali la lidocaina, che antiepilettici, quali la fenitoina (e il suo derivato più idrosolubile fosfenitoina), il topiramato, il valproato e la zonisamide, hanno mostrato azioni neuroprotettive in modelli animali in vivo di ischemia globale e/o focale. Il blocco del sovraccarico di Na^+ nei neuroni può avere vari effetti protettivi, tra cui risparmiare ATP, impiegato dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi nel tentativo di ristabilire i gradienti ionici fisiologici; impedire la reversione dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e dei trasportatori del glutammato, e quindi l'accumulo intracellulare di Ca^{2+} e quello extracellulare di glutammato; diminuire il rigonfiamento osmotico cellulare. Il riluzolo, un farmaco che rappresenta l'unico rimedio terapeutico oggi disponibili per il trattamento della sclerosi laterale amiotrofica, una grave patologia degenerativa dei motoneuroni, sembra esercitare la sua attività farmacologica in seguito al blocco di canali del sodio; tuttavia, tale molecola sembra anche provvista di effetti attivatori su alcune classi di canali al K^+ e di azioni antigitluttamatergiche dirette.

Canali al calcio

Una famiglia di canali con proprietà funzionali e sensibilità farmacologica differenziali

I canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti si suddividono in vari sottotipi con differenti caratteristiche cinetiche, funzionali, di modulazione farmacologica e di localizzazione tissutale e cellulare. Tale eterogeneità trova riscontro nelle molteplici isoforme molecolari fino a oggi clonate (Tabella 22.5). Da un punto di vista biofisico, i canali al Ca^{2+} si possono raggruppare in due classi: quelli a bassa soglia (*Low Voltage-Activated, LVA*), che si

aprono cioè in risposta a depolarizzazioni del potenziale di membrana inferiori a -50 mV, e quelli ad *alta soglia* (*High Voltage Activated*, HVA), che si attivano quando il potenziale di membrana raggiunge valori superiori a -40 mV. Oltre alla soglia differenziale di attivazione, i canali LVA sono caratterizzati da una più marcata tendenza all'inattivazione rispetto ai canali HVA (ragion per cui vengono anche detti anche T o "transienti"), da una più lenta cinetica di chiusura in seguito a ripolarizzazione del potenziale di membrana a valori negativi, nonché da una permeabilità al Ca^{2+} analoga a quella per il Ba^{2+} , laddove i canali HVA sono più permeabili al Ba^{2+} . Inoltre, i canali HVA e LVA presentano importanti caratteristiche distintive rispetto al blocco da parte di cationi inorganici (gli LVA sono bloccati più efficacemente dal Ni^{2+} rispetto al Cd^{2+} , al contrario degli HVA) e di molecole organiche del gruppo dei Ca^{2+} antagonisti quali le diidropiridine (vedi oltre) e l' ω -conotossina GVIA, che sono attive sui canali HVA ma non su quelli LVA (Tabella 22.5).

I canali HVA costituiscono, da un punto di vista funzionale e molecolare, una classe piuttosto eterogenea. Infatti, essi sono stati classificati in vari sottotipi (L, N, P/Q, R) utilizzando criteri in parte funzionali e in parte farmacologici. I canali L ("lunga durata") sono presenti a livello muscolare, cardiaco e cerebrale, e sono sensibili al blocco da diidropiridine quali nifedipina o nimodipina. Inoltre, essi sono selettivamente attivati da agenti quali il BayK 8644 o l'SZ(+)-(s)-202-791. I canali N (neuronal) rappresentano la principale conduttanza ad alta soglia delle cellule nervose, e sono insensibili alle diidropiridine, ma vengono bloccati selettivamente dalla ω -conotossina GVIA, una tossina presente nel veleno della lumaca marina *Conus geographus* (vedi CD: Approfondimento 22.3. *Tossine peptidiche naturali*). Le cellule di Purkinje del cervelletto possiedono una conduttanza al Ca^{2+} con caratteristiche cinetiche diverse rispetto al canale N e quasi completamente insensibile sia alle diidropiridine che alla ω -conotossina GVIA. Tale conduttanza, denominata P (Purkinje), è invece selettivamente sensibile ad altre tossine del veleno di ragni, in particolare alla ω -agatossina IVA e alla FTX (*Funnel Spider Venom Toxin*). Anche altre cellule nervose, come le cellule granulari del cervelletto, possiedono correnti al Ca^{2+} sensibili alla ω -agatossina IVA, ma in questo caso occorrono concentrazioni di tossina ben superiori a quelle usate per bloccare i canali P. Queste correnti sono state denominate Q, ma non è chiaro se rappresentino entità distinte rispetto alle P; è quindi preferibile definire P/Q le correnti ω -agatossina IVA-sensibili. Infine, le cellule granulari presentano una quota residua di conduttanza al Ca^{2+} insensibile a tutti gli agenti che bloccano i canali L, N, e P/Q. Tale corrente è stata denominata R (ovvero "resistente"), ed è caratterizzata da un'alta sensibilità al blocco da Ni^{2+} , simile a quella dei canali T.

■ Localizzazione e funzioni dei canali del Ca^{2+}

Le caratteristiche biofisiche distintive dei canali LVA e HVA rendono ragione di un diverso ruolo fisiologico di

queste due classi di canali: gli LVA sono importanti nel controllo dell'eccitabilità e dell'attività ritmica di cellule muscolari o nervose, laddove gli HVA sono principalmente responsabili degli aumenti di Ca^{2+} citosolico necessari per l'azione da "secondo messaggero" di questo ione (vedi Capitolo 10). Tali differenti ruoli funzionali trovano riscontro in una selettiva localizzazione cellulare e sub-cellulare di tali proteine. Nei neuroni, i canali LVA sono localizzati prevalentemente a livello dendritico, dove regolano la responsività agli stimoli sinaptici, laddove gli HVA di tipo L hanno prevalente localizzazione a livello del soma e della base dei dendriti maggiori, onde consentire al Ca^{2+} intracellulare il suo ruolo di controllo dell'espressione genica, della regolazione di enzimi, dell'organizzazione del citoscheletro. Gli HVA di tipo N, R e P/Q, sono prevalentemente localizzati a livello dei terminali sinaptici, dove regolano la liberazione di neurotrasmettitori. A livello cardiaco, mentre i canali HVA sembrano non mostrare differenze di localizzazione, i canali LVA sono prevalentemente espressi nelle cellule del nodo seno-atriale e del tessuto di conduzione, laddove sono assenti nel tessuto muscolare ventricolare adulto, pur venendo transientemente espressi durante l'embriogenesi e potendo ricomparire nel tessuto adulto in seguito a stati patologici quali l'ipertrofia cardiaca. I canali HVA muscolari scheletrici, prevalentemente di tipo L, sono concentrati selettivamente a livello delle triadi (vedi Capitolo 9; vedi CD: Approfondimento 22.4. *Fisiopatologia e farmacologia della contrazione muscolare*), dove regolano il processo di liberazione del Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico. È stato inoltre recentemente osservato che esiste una stretta co-localizzazione tra due classi di canali funzionalmente interdipendenti, i canali voltaggio-dipendenti al Ca^{2+} e i canali al K^+ Ca^{2+} -attivati [K(Ca)]; tale co-localizzazione sembra essere specifica per sottotipi delle due classi: i canali L co-localizzano con i canali SK a livello del soma neuronale, mentre gli N con i BK a livello delle terminazioni presinaptiche.

■ I canali del Ca^{2+} sono complessi macromolecolari che si localizzano in un nano-ambiente specializzato

I canali al Ca^{2+} formano dei complessi etero-oligomericici (Figura 22.7A) nei quali la subunità principale α_1 forma il poro ionico e possiede i siti di legame per agonisti e antagonisti. La prima subunità α_1 ($\alpha_1 S$) è stata purificata e poi clonata dalle triadi del muscolo scheletrico. Essa è un grosso polipeptide con domini analoghi a quelli della subunità α del canale al Na^+ (Figura 22.7A). L'omologia è elevata soprattutto nelle zone idrofobiche, mentre vi è divergenza in quelle idrofiliche. A oggi sono state clonate almeno 9 subunità α_1 diverse, che spesso danno vita a più prodotti di "processamento" alternativo. Valutando le caratteristiche funzionali e farmacologiche dei canali ricombinanti espressi in sistemi eterologhi si sono attribuite delle corrispondenze con i sottotipi noti: le subunità $\alpha_1 C$ e D formano canali L, le $\alpha_1 B$ i canali N, le $\alpha_1 A$ i canali P/Q, le $\alpha_1 E$ i canali R, e le $\alpha_1 G, H$ e I i canali T (Tabella 22.5). Oltre alla subunità principale,

TABELLA 22.5 Classificazione e proprietà dei canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti

Sottofamiglie (simbolo del gene)	CACNA1S Cav1.1 (α_{1S})	CACNA1C Cav1.2 (α_{1C})	CACNA1D Cav1.3 (α_{1D})	CACNA1F Cav1.4 (α_{1F})	CACNA1A Cav2.1 (α_{1A})
Tessuto	Muscolo scheletrico	Cuore, muscolo liscio, SNC, cellule endocrine	SNC, pancreas, rene, ovaio, orecchio interno	Retina	SNC (terminazioni nervose, dendriti, alcuni corpi cellulari), cuore, coclea, ipofisi, pancreas
Bloccanti	Siti per DHP ^a , fenilalchilamine ^b , benzotiazepine ^c	Siti per DHP, fenilalchilamine, benzotiazepine	Siti per DHP, fenilalchilamine, benzotiazepine	DHP	ω -AgalIVA; ω -CtxMVIC
Attivatori	BayK8644, FLP64176	BayK8644, FLP64176	BayK8644		
Tipo di corrente	L	L	L	L	P/Q
Cromosoma	1q31-32	12p13.3	3p14.3	Xp11.23	19p13.2
Varianti di spicing		α_{1C-a} , cuore; α_{1C-b} , muscolo liscio; α_{1C-c} , cuore, CNS, ipofisi;			Cav2.1a, Cav2.1b
Fisiologia	Contrazione muscolare scheletrica (vedi CD: Approfondimento 22.3)	Contrazione cardiaca e muscolare liscia; signalling in cellule neuroendocrine	Signalling in cellule neuroendocrine; attività pacemaker in cellule striatali (soppressa dalla dopamina)	Liberazione di neurotrasmettitori dai coni e cellule bipolari; visione dei colori	Liberazione di neurotrasmettitori, signalling neuronale
Farmacologia, bersaglio		Antiarritmici, vasodilatatori, antianginosi			Analgesici, neuroprotettori
Canalopatie	Disgenesia muscolare nel topo; Hypo-PP e suscettibilità all'ipertermia maligna nell'uomo		Il topo KO presenta sordità, disfunzione seno-atriale ed atrio-ventricolare, deficit secrezione insulina	XLCSNB	EA-2; FMH; SCA-6. Mutazione tottering nel topo

^a Principali farmaci che interagiscono con il sito per le diidropiridine: nifedipina, nicardipina, nitrendipina, nisoldipina, felodipina, isradipina, amlodipina, nimodipina

^b Principali farmaci che interagiscono con il sito per le benzotiazepine: diltiazem, clentiazem, diclofurima

^c Principali farmaci che interagiscono con il sito per le fenilalchilamine: verapamil, gallopamil, levemopamil, anipamil, devapamil, tiapamil

i canali al Ca^{2+} possiedono varie subunità accessorie. I canali L del muscolo scheletrico possiedono una subunità α_2 cui è legata covalentemente la subunità δ , oltre a una subunità β (presente in varie forme di "processamento" alternativo) e una subunità γ . Le subunità α_2 - δ e γ sono proteine di membrana mentre la subunità β si associa ad α_1 a livello intracellulare. Tutte queste subunità accessorie sono fondamentali per una corretta espressione in membrana e funzione del canale. Inoltre, più recentemente, sono state descritte funzioni per tali subunità accessorie parzialmente o totalmente indipendenti dalla loro regolazione dell'attività del canale del Ca^{2+} al quale sono associate, tra cui la regolazione della trascrizione genica e la formazione di terminali sinaptici a livello della placca neuromuscolare, nonché la stabilità di alcuni mRNA inclusi quelli codificanti per le stesse subunità dei canali del calcio.

Tale complessa regolazione sembra svolgersi attraverso la costituzione di un complesso multimolecolare che costituisce un "nanoambiente" essenziale alle interazioni del canale con molteplici vie trasduzionali. Recentemente, è stato infatti messo in evidenza, con tecniche di nanoproteomica, che più di 200 proteine sarebbero associate ai canali Cav2.2: pompe, canali ionici, recettori accoppiati a proteine G, chinasi e fosfatasi, enzimi, proteine della matrice extracellulare, proteine del citoscheletro, proteine

del complesso SNARE che controllano l'esocitosi (Figura 22.7b e vedi anche Capitolo 32 e CD: Approfondimento 32.2). In tali complessi, localizzati a livello dei raft lipidici ricchi di colesterolo, potrebbero dunque verificarsi importanti regolazioni dell'attività di canali ionici da parte di alterazioni nel metabolismo lipidico.

Va infine sottolineato come, con la definizione dell'organizzazione strutturale dei diversi canali del Ca^{2+} , e in particolare con il clonaggio delle loro diverse subunità, è diventato possibile avvalersi degli strumenti della biologia molecolare per acquisire nuove informazioni sul significato funzionale di ciascuno di essi. In particolare, preziose informazioni sul ruolo funzionale dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti ci provengono dallo studio del fenotipo di topi knockout per ciascuna delle subunità α_1 o delle subunità accessorie e di pazienti affetti da rare sindromi genetiche determinate da mutazioni di queste stesse proteine (Tabella 22.1; vedi CD: Approfondimento 22.5. Fisiopatologia dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti: studi di genetica animale e umana).

■ Farmacologia dei canali al calcio

L'eterogeneità funzionale e strutturale dei canali del Ca^{2+} rende estremamente complessa l'identificazione di farmaci che agiscano selettivamente su di una classe di tale famiglia. Molti strumenti farmacologici sono stati

CACNA1B Cav2.2 (α_{1B})	CACNA1E Cav2.3 (α_{1E})	CACNA1G Cav3.1 (α_{1G})	CACNA1H Cav3.2 (α_{1H})	CACNA1I Cav3.3 (α_{1I})
Neuroni (terminazioni nervose, dendriti, corpi cellulari)	Neuroni (corpi cellulari, terminazioni nervose, dendriti)	Cuore, neuroni, placenta, ovaio	Cuore, neuroni, rene, fegato, midollare del surrene	Neuroni
ω -CtxGVI; ω -CtxMVIIA (SNX-111 o ziconotide), ω -CtxMVIIC	Nichel (27 μ M); SNX-482 (tarantula toxin)	Nichel (250 μ M); kurtoxin; mibefradil, etosuccimide	Nichel (12 μ M); kurtoxin; mibefradil, etosuccimide	Nichel (216 μ M); mibefradil, etosuccimide
N	R	T	T	T
9q34	1q25-1q32	17q22	16p13.3	22q12.3-13.2
Cav2.2a, Cav2.2b	Cav2.3a, Cav2.3b			
Liberazione di neurotrasmettitori, signalling neuronale	Liberazione di neurotrasmettitori, signalling neuronale; firing ripetitivo	Attività segnapasso cardiaca; frequenza di scarica neuronale; comportamenti oscillatori in neuroni talamici	Attività segnapasso cardiaca; frequenza di scarica neuronale; comportamenti oscillatori in neuroni talamici; secrezione ormonale	Attività segnapasso; frequenza di scarica neuronale; comportamenti oscillatori in neuroni talamici
Analgesici, neuroprotettori		Antiepilettici, analgesici	Antiepilettici, analgesici	Antiepilettici, analgesici

DHP: diidropiridine; EA-2: atassia episodica di tipo 2; FHM 1: emicrania emiplegica familiare di tipo 1; XLCSNB: cecità notturna congenita stazionaria associata all'X; Hypo-PP: paralisi periodica ipokaliemica; SCA-6: atassia spino-cerebellare di tipo 6

utilizzati nel corso degli anni come mezzi d'indagine per dissezionare i vari sottotipi di canali al Ca^{2+} e per identificarne le proprietà funzionali e la distribuzione tessutale. Tra questi, cationi inorganici quali Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , La^{3+} e Gd^{3+} , sono tutti potenti bloccanti dei canali al Ca^{2+} in quanto si legano all'interno del poro ionico in maniera voltaggio-dipendente, e competono con il Ca^{2+} per il suo sito, bloccando pertanto il flusso di ioni all'interno del canale stesso. Sebbene a concentrazioni millimolari essi blocchino in modo aspecifico tutti i canali al Ca^{2+} , concentrazioni micromolari mostrano una certa selettività per alcune sottoclassi (Tabella 22.5). Analogamente, varie tossine peptidiche e non bloccano selettivamente sottotipi diversi di canali al Ca^{2+} e rappresentano uno strumento eccezionale di indagine farmacologica (vedi CD: Approfondimento 22.3). Tuttavia, sia i cationi inorganici che le tossine estratte da veleni animali hanno al momento attuale un interesse terapeutico piuttosto limitato. Viceversa, i cosiddetti "calcio-antagonisti" sono un'importante classe di molecole organiche a basso peso molecolare dall'ampio spettro terapeutico che comprende azioni antipertensive, antiaritmiche e antianginose, nonché altre ancora potenziali azioni a livello del SNC; tali farmaci modulano in senso inibitorio i canali voltaggio-dipendenti al Ca^{2+} . In genere si tratta di bloccanti dei

canali L, anche se recentemente sono state sintetizzate molecole con una certa selettività per i canali N e T.

■ Farmaci bloccanti dei canali del Ca^{2+} di tipo L

Il concetto di farmaci "calcio-antagonisti" fu sviluppato dai gruppi di Fleckenstein e Godfraind fin dagli anni 60, in seguito all'osservazione che nuove molecole ad attività vasodilatatrice (verapamil) possedevano azioni cronotrope e dromotrope negative di cui i nitroderivati erano sprovvisti. Fu negli anni 70 che venne formulata l'ipotesi che tali molecole interferissero con il processo di accoppiamento eccitazione-contrazione mediante un blocco dell'influsso di Ca^{2+} transmembrana, coniano il termine di Ca^{2+} -antagonisti. Il rapido avanzamento delle conoscenze prima funzionali e poi biochimico-molecolari sulla struttura dei canali del Ca^{2+} , unitamente all'introduzione di nuove classi chimiche di molecole Ca^{2+} -antagoniste dotate di diversa selettività tessutale (diidropiridine), ha poi fornito la dimostrazione di tale ipotesi, chiarendo come le attività farmacologiche di tali molecole fossero attribuibili a un'interazione diretta con i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti.

I farmaci più noti e più utilizzati in terapia sono quelli che agiscono sui canali di tipo L e fanno capo a tre principali classi chimiche: le diidropiridine, le benzotiazepine e le fenilalchilamine. Sulla subunità α_1 del canale di tipo L

vi sono tre siti di legame distinti per queste sostanze; il legame di un farmaco al proprio sito influenza con un meccanismo allosterico il legame degli altri farmaci agli altri siti, con effetti sia di potenziamento che di antagonismo reciproco. L'interazione di tali farmaci con i canali del Ca^{2+} ha caratteristiche generali (frequenza- e voltaggio-dipendenza) e siti di ricognizione molecolari (domini IIIS₅, IIIS₆, regione linker IVS₅-IVS₆, e IVS₆) in parte analoghi a quelli descritti per le azioni di farmaci anestetici locali a livello dei canali del Na^+ .

Va sottolineato come, sebbene tutte e tre le classi di farmaci prima menzionate interagiscano con i canali del Ca^{2+} di tipo L, essi presentano interazioni differenziali con i diversi canali di tipo L (α_1 C, α_1 D, α_1 S) o tra le isoforme di questi prodotte da processi di splicing alternativo.

Indicazioni cardiovascolari e non dei calcio-antagonisti bloccanti i canali del Ca^{2+} di tipo L (vedi CD: Approfondimento 22.4)

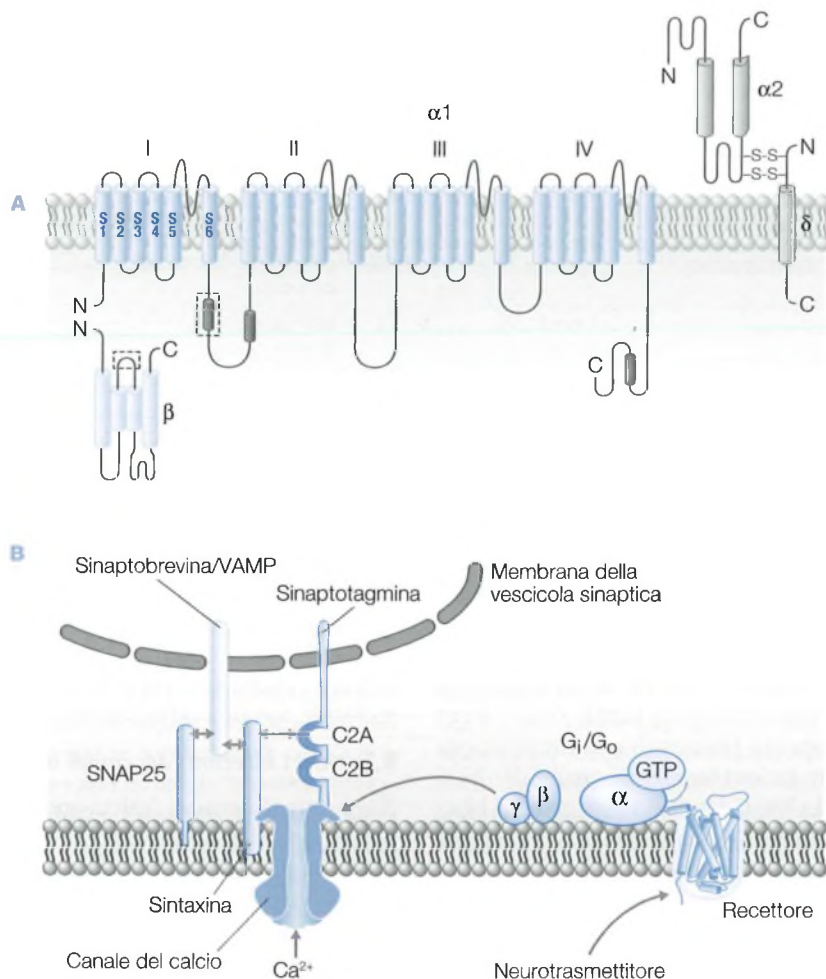


FIGURA 22.7 Topologia di membrana dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti e loro ruolo nell'esocitosi di neurotrasmettitori.

A. I membri della famiglia Cav1 e Cav2 dei canali voltaggio-dipendenti del Ca^{2+} consistono di una subunità α_1 che forma il poro contenente quattro domini (I-IV), ciascuno con sei segmenti transmembrana e una regione rientrante che forma il poro tra i segmenti S₅ ed S₆. La subunità α_1 si associa con una subunità β intracellulare e una subunità α_2 interamente extracellulare, quest'ultima legata attraverso ponti disolfuro a una subunità δ a singolo tratto transmembrana. In alcuni canali, esiste anche una subunità γ (non mostrata in figura). I membri della famiglia Cav3 potrebbero contenere solo le subunità α_1 , ma la loro composizione esatta è ancora incerta. (Da: Budde T et al. Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:873-83, modificata).

B. L'entrata del Ca^{2+} attraverso i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti attiva l'esocitosi di neurotrasmettitori innescando la fusione delle membrane delle vescicole secretorie con la plasmamembrana attraverso la partecipazione del complesso delle proteine SNARE [Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) REceptor] costituito da sintaxina, SNAP-25, e VAMP/sinaptobrevina. La funzione delle proteine SNARE è regolata da numerose interazioni con altre proteine, inclusa la proteina della membrana sinaptica legante il Ca^{2+} sinaptotagmina; tali proteine vengono specificamente tagliate da tossine clostridiche (tetaniche e botuliniche), che esercitano così un'azione inibitoria sulla liberazione di neurotrasmettitori. I canali del Ca^{2+} presinaptici facilitano il posizionamento delle vescicole nelle regioni dove gli aumenti di Ca^{2+} intracellulari possono tradursi efficacemente nella liberazione dei neurotrasmettitori. Tale processo è regolato da numerosi neurotrasmettitori che, agendo su recettori presinaptici, modulano i canali del Ca^{2+} mediante loro interazione (diretta o indiretta) con le G-proteine. (Da: Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:521-55, modificata)

Il blocco dei canali del Ca^{2+} di tipo L da parte delle molecole prima menzionate è alla base dell'ampio utilizzo clinico di queste come farmaci antipertensivi, antischemici e antiaritmici. Come prima accennato, la sensibilità farmacologica differenziale dei canali del Ca^{2+} di tipo L nei diversi distretti fa sì che non tutte e tre le classi di farmaci Ca^{2+} -antagonisti (diidropiridine, benzotiazepine e fenilalchilamine) vengano utilizzate con le medesime indicazioni. In particolare, le *diidropiridine* presentano una maggiore selettività per i canali L della muscolatura liscia vascolare rispetto a quella striata cardiaca. Tale selettività vascolare sembra derivare da un insieme di fattori, tra i quali un ruolo determinante sembrano giocare le diverse isoforme di subunità α_1 C espresse (particolarmente nella regione IS_6 , dove la sequenza primaria dell'isoforma α_1 C-b, espressa a livello muscolare liscio, diverge da quella dell'isoforma α_1 C-a espressa a livello cardiaco), dallo stato-dipendenza dell'interazione farmaco-canale (le diidropiridine interagiscono preferenzialmente con lo stato inattivato del canale, che è maggiormente rappresentato a livello del tessuto vascolare rispetto a quello cardiaco), nonché dalle proprietà farmacocinetiche della molecola e dalle diverse modalità di mobilitazione del Ca^{2+} a livello dei due distretti. A livello *vascolare*, i calcio-antagonisti agiscono selettivamente sui canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti delle cellule muscolari lisce, senza influenzare, se non ad alte concentrazioni, gli aumenti della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indotti da altri stimoli che mobilitano il Ca^{2+} dai depositi intracellulari o ne attivano l'influsso da canali non voltaggio-dipendenti. A dosi efficaci nel ridurre le resistenze vascolari periferiche, le diidropiridine sono praticamente prive di effetti diretti inibitori sull'attività cardiaca, la quale è anzi caratterizzata da aumentati cronotropismo e inotropismo dovuti all'attivazione di riflessi simpatici secondari alle ridotte resistenze periferiche (soprattutto le molecole di "prima generazione"; vedi oltre). Alcune diidropiridine, come la nicardipina, sembrano inoltre agire con una certa selettività sulle arterie coronarie, mentre altre, come la nimodipina, su quelle cerebrali. I calcio-antagonisti sono assai più efficaci sulla muscolatura liscia arteriosa che su quella venosa, riducendo quindi le resistenze periferiche senza influenzare il ritorno venoso.

Le *fenilalchilamine* e le *benzotiazepine* agiscono sulle resistenze periferiche solo a concentrazioni che provocano blocco dei canali al Ca^{2+} cardiaci, con conseguente riduzione del ritmo, della velocità di conduzione atrio-ventricolare e dell'inotropismo. Questa attività diretta sul cuore può essere desiderata, ad esempio, per determinare effetti antipertensivi combinati all'antagonismo della stimolazione cardiaca dovuta ai riflessi simpatici. Tuttavia, queste due classi di farmaci vanno usate con cautela in pazienti con preesistenti alterazioni cardiache, vista la possibilità di indurre blocco della conduzione o scompenso cardiaco.

Alla luce di queste considerazioni, tra i vari calcio-antagonisti, le diidropiridine risultano i farmaci di prima scelta come *antipertensivi* e *antianginosi* e nella prevenzione del vasospasmo cerebrale postemorragico.

L'ampia esperienza trentennale su scala mondiale nell'utilizzo clinico dei farmaci Ca^{2+} -antagonisti ne ha recentemente consentito la classificazione in tre generazioni: la "prima generazione" comprende le molecole convenzionali (verapamil, diltiazem, nifedipina, felodipina, isradipina, nicardipina, nitrendipina), caratterizzate da una durata d'azione relativamente breve, tale da richiedere somministrazioni multiple giornaliere. Le diidropiridine di "prima generazione" determinano una rapida vasodilatazione periferica, con conseguente stimolazione simpatica e del sistema renina-angiotensina; pertanto, esse possono causare ipotensione, cefalea, nausea e, più raramente, edemi periferici e/o polmonari. L'intensa ipotensione e conseguente riduzione del flusso coronarico possono precipitare gravi eventi anginosi o infartuali a livello cardiaco o cerebrale; una meta-analisi dei trial clinici condotti su pazienti con infarto miocardico acuto suggerisce che il trattamento con tali diidropiridine potrebbe addirittura determinare un aumentato rischio di ricaduta o di mortalità. Questo rischio è minore per le altre classi di calcio-antagonisti che hanno azione vasodilatante meno pronunciata. In questi particolari casi, può rivelarsi utile associare alla diidropiridine un beta-bloccante per bloccare il riflesso simpatico. Bisogna invece fare molta attenzione ad associazioni tra fenilalchilamine e β -bloccanti, che possono portare a sommazione di effetti cardiodepressivi.

Appartengono alla "seconda generazione" molecole di prima generazione, somministrate però in formulazioni a lento rilascio, che consentono una singola somministrazione giornaliera e presentano una minore incidenza di tachicardia riflessa. Le molecole di "terza generazione" sono molecole intrinsecamente dotate di una lunga durata d'azione, in virtù di specifiche caratteristiche farmacocinetiche, rappresentate soprattutto da una prolungata emivita plasmatica (amlodipina), o da una maggiore liposolubilità, che ne condiziona una maggiore ripartizione nella membrana plasmatica e quindi una prolungata durata d'azione, anche a fronte di un'emivita plasmatica relativamente breve (lercanidipina, lacidipina, manidipina). Studi clinici condotti con tali farmaci di terza generazione (PREVENT: amlodipina; CAPARES: lacidipina) hanno dimostrato che essi riducono significativamente la progressione della malattia aterosclerotica; tale azione sembra solo parzialmente riconducibile alla loro attività Ca^{2+} -antagonista, ma coinvolgerebbe anche proprietà farmacologiche addizionali, quali attività antiossidanti, l'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce neointimali, l'aumento della produzione di nitrossido, l'inibizione dell'apoptosi endoteliale indotta da citochine, e la modulazione della deposizione di matrice extracellulare. D'altra parte, sono state recentemente sperimentate anche diidropiridine di terza generazione aventi durata d'azione ultrabreve somministrabili per via endovenosa (clevidipina), che potrebbero risultare estremamente utili nel controllo rapido perioperatorio delle emergenze ipertensive.

Di recente si è dimostrato che alcune diidropiridine di terza generazione come la benidipina o l'efonidipina, ol-

tre a bloccare i canali L, sono anche dei potenti bloccanti dei canali del calcio di tipo T, e si è sottolineato che tale attività farmacologica potrebbe avere delle importanti conseguenze cliniche. I canali di tipo T, infatti, controllano il tono delle arteriole glomerulari efferenti e la vasodilatazione glomerulare determinata dal loro blocco potrebbe giustificare il fatto che i calcio-antagonisti con attività bloccanti i canali T si siano dimostrati molto più efficaci degli altri nel proteggere il rene dalla nefropatia ipertensiva.

A livello *cardiaco* i calcio-antagonisti agiscono bloccando i canali L del nodo del seno, del nodo atrio-ventricolare, delle fibre di conduzione e dei miociti delle pareti contrattili. Il ritmo "pace-maker" del nodo del seno è rallentato, la velocità di conduzione atrio-ventricolare ridotta e la forza contrattile diminuita. In questo distretto, le fenilalchilamine (verapamil, gallopamil) sono molto più potenti delle diidropiridine, mentre le benzotiazepine (diltiazem) hanno potenza intermedia; l'efficacia cardiaca di questi farmaci ne consente l'utilizzo come *antiaritmici* (di classe IV, Tabelle 22.4 e 22.5), in particolare nel trattamento acuto di diverse forme di tachiaritmie sopraventricolari.

I bloccanti dei canali L hanno effetti anche in *altri distretti* oltre a quello cardiovascolare. I canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti sono pressoché ubiquitari, anche se, ad esempio nel sistema nervoso, tali canali sono prevalentemente di tipo non L (T, N, P/Q ecc.) e quindi insensibili ai classici calcio-antagonisti. Tuttavia una certa quota di canali L è comunque presente nei neuroni e nelle cellule gliali, e il loro blocco da parte dei classici calcio-antagonisti potrebbe rivelarsi utile per impedire un eccessivo influsso di ioni Ca^{2+} e quindi avere azioni *neuroprotettive*.

Nelle cellule ormono-secerenti (cellule β -pancreatiche insulino-secerenti, ipofisarie, cromaffini del surrene) sono presenti canali sia di tipo L che di tipo non L, ed entrambi partecipano all'influsso di calcio responsabile del rilascio ormonale. I calcio-antagonisti non hanno precise indicazioni terapeutiche a questo livello, tuttavia bisogna tenere in considerazione che calcio-antagonisti somministrati per altri motivi potrebbero influenzare la fisiologia di questi altri organi, o esacerbare condizioni di inefficiente rilascio ormonale (ad esempio, insulina e diabete mellito).

Indicazioni terapeutiche dei farmaci bloccanti i canali del Ca^{2+} di tipo non-L

Alcune nuove molecole ad azione Ca^{2+} -antagonista ma con profilo non tipicamente L sono entrate in terapia o sono state valutate in trial clinici con diverse indicazioni terapeutiche. Assai promettente era apparso in questo rispetto il mibefradil, che blocca i canali T periferici con un'affinità 10-30 volte maggiore rispetto agli L. Pertanto, il mibefradil pare agire in modo piuttosto selettivo a livello vascolare, in particolare sui vasi coronarici senza modificare l'inotropismo cardiaco. Tuttavia, a un anno dal suo ingresso nel mercato come *antipertensivo* e *antischemico* nell'angina stabile, il mibefradil venne ritirato nel 1998 perché, interagendo con il citocromo P450 3A4

e 2D6, determinava un elevato rischio di interazioni farmacocinetiche con altri farmaci metabolizzati da tali isoforme enzimatiche.

Molecole come flunarizina e lifarizina sono allo studio come antischemici cerebrali. Esse non sono dei Ca^{2+} -antagonisti classici perché, oltre ai canali L, inibiscono anche i T e i canali al Na^+ centrali, e probabilmente la loro azione *neuroprotettiva* dipende proprio dalla combinazione degli effetti su questi diversi canali ionici. Alcuni *anticonvulsivanti* come l'etosuccimide, particolarmente efficace nelle crisi di "piccolo male", devono invece la loro efficacia terapeutica principalmente alla capacità di inibire i canali T dei neuroni talamici, i quali hanno caratteristiche funzionali specifiche e sono coinvolti nei meccanismi di sincronizzazione talamo-corticale alla base delle scariche epilettiche generalizzate che caratterizzano tale forma di epilessia.

I canali di tipo N e P/Q sono presenti nelle terminazioni nervose e partecipano al controllo del rilascio dei neurotrasmettitori; in particolare, esiste un'alta densità di canali N nei neuroni delle corna dorsali del midollo spinale che ricevono l'innervazione dalle fibre afferenti nocicettive A δ e C. Per tale motivo, è stata lungamente studiata la possibilità di sviluppare degli analoghi sintetici di quelle tossine naturali che bloccano selettivamente tali canali, interrompendo così la trasmissione degli stimoli algogeni. Uno di questi derivati, la ziconotide (un analogo sintetico della ω -conotossina MVIIA che blocca selettivamente i canali N), è stata approvata sia in Europa che negli USA per il *trattamento del dolore grave* in pazienti intolleranti o refrattari alle terapie convenzionali. Rispetto agli analgesici narcotici, composti come la ziconotide presentano il vantaggio di poter essere usati su base cronica senza dar vita a fenomeni di tolleranza; tuttavia, la struttura peptidica della ziconotide rende necessaria la sua somministrazione diretta per via intratecale. Inoltre, pur inducendo alcuni effetti indesiderati quali tremori e ipotensione ortostatica, la ziconotide ha mostrato efficacia come *agente neuroprotettivo* in modelli animali sia di ischemia globale che focale, anche quando somministrato diverse ore dopo l'insulto ischemico.

Il trattamento del dolore rappresenta l'indicazione terapeutica primaria anche dei gabapentinoidi. Si tratta di una nuova classe di farmaci che interferiscono con l'attività dei canali del calcio voltaggio-dipendenti legandosi alla subunità α_2/δ ; in tale classe, ritroviamo molecole come la gabapentina e il pregabalin, molto utilizzate in clinica per il trattamento del dolore neuropatico e, in misura minore, dell'*epilessia*. La storia di queste molecole è interessante perché esse furono originariamente sviluppate come analoghi del GABA con una maggiore capacità di attraversare la barriera ematoencefalica. La loro attività antidolorifica si è, però, dimostrata indipendente dal GABA e criticamente correlata, invece, alla capacità di tali farmaci di legare la subunità α_2/δ dei canali del Ca^{2+} . I gabapentinoidi non alterano acutamente le proprietà elettriche dei canali HVA, ma piuttosto compromettono il traffico intracellulare della subunità α_2/δ e, con essa, della subunità Cav2.1 e Cav2.2. È interessante

sottolineare che tali effetti si esplicano solo in presenza di un sottotipo specifico di subunità β , la β_4 , e che ciò potrebbe giustificare la specificità delle attività farmacologiche di tali molecole.

Farmaci che modulano i canali al Ca^{2+} per interazione con sistemi recettoriali

Molti neurotrasmettitori, interagendo con i propri recettori, esercitano un'azione modulatoria indiretta di tipo inibitorio sui canali al Ca^{2+} neuronali, riducendone l'attività e rallentandone la cinetica. Questa attività modulatoria ha importanti implicazioni per la neurotrasmissione, in quanto riduce il rilascio presinaptico dei trasmettitori. Essa è utilizzata anche a scopo terapeutico, ad esempio nella *analgesia* e nella *neuroprotezione*, dove vengono somministrati agonisti selettivi di recettori accoppiati all'inibizione di canali al Ca^{2+} . Tra questi recettori, i metabotropici di gruppo II e III per gli amminoacidi eccitatori, i GABA_B per il GABA, gli α_2 per la noradrenalina, gli A_1 per l'adenosina, i k per gli oppioidi ecc. Nella maggior parte dei casi l'inibizione è a carico del canale di tipo N, anche se sporadici risultati suggeriscono effetti anche sui canali di tipo T, L e P/Q. L'inibizione del canale è solitamente voltaggio-dipendente (con uno sblocco per forti depolarizzazioni) e mediata da G proteine: può essere rapida (accoppiamento diretto tra le subunità $\beta\gamma$ della G proteina e il canale) o più lenta (mediata da secondi messaggeri intracellulari). Con meccanismi analoghi, alcuni ormoni o neurotrasmettitori modulano invece in modo stimolatorio i canali al Ca^{2+} . Classica rimane in questo senso, la stimolazione del canale di tipo L cardiaco in seguito all'attivazione del recettore β_1 -adrenergico (vedi anche Capitoli 9 e 10 e **CD**: Approfondimento 6.3). Questa azione ha importanti ripercussioni sull'inotropismo cardiaco, e agonisti come la noradrenalina o la dopamina vengono usati in caso di shock cardiogeno proprio per aumentare l'inotropismo.

Canali al potassio

I canali al K^+ assolvono funzioni eterogenee e ubiquitarie in cellule eccitabili e non

I canali al K^+ rappresentano la classe di canali ionici più vasta e funzionalmente eterogenea oggi conosciuta; essi sono presenti in tutte le cellule eucariote e nei procarioti. I canali al K^+ assolvono una funzione stabilizzatrice del potenziale di membrana: essi cioè portano il potenziale di membrana verso il potenziale di equilibrio del K^+ e lo allontanano dal valore soglia per il "firing" dei potenziali d'azione in cellule eccitabili. Inoltre, essi accorciano la durata dei potenziali d'azione, pongono termine a periodi di intensa attività elettrica, determinano la durata degli intervalli tra i potenziali d'azione durante il "firing" ripetitivo, e, in generale, riducono l'efficacia delle afferenze eccitatorie a una cellula. Oltre a questi ruoli nella segnalazione elettrica, i canali al K^+ partecipano al trasporto dei soluti negli epitelii, mentre la loro presenza nelle cellule

giali aiuta a rimuovere dagli spazi intercellulari gli ioni K^+ in eccesso.

I canali al K^+ sono complessi tetramericici con subunità a 2, 4 o 6 segmenti transmembrana

L'eterogeneità funzionale prima descritta trova riscontro in un'ampia varietà genetica; nell'uomo sono stati identificati più di 70 geni che codificano per proteine aventi la funzione di subunità di canali del K^+ . Il clonaggio molecolare di tali geni ha consentito una classificazione di tali proteine sulla base della disposizione topologica predetta dalla loro sequenza primaria. Come appare chiaro dalla figura 22.4, esistono tre classi di subunità che possono formare canali al K^+ : 1. la classica famiglia a sei segmenti transmembrana (6TM) che comprende attualmente almeno dodici sottofamiglie, con differenze notevoli sia fra le sottofamiglie, che tra i loro membri; come accennato precedentemente, a tale famiglia appartengono i canali voltaggio-dipendenti (K_v1 - K_v12), caratterizzati dalla presenza, in ciascuna subunità, di un sensore del voltaggio (S_1 - S_4) e di un poro ionico (S_5 - S_6); 2. la famiglia dei canali a 2 segmenti transmembrana (2TM), omologhi ai segmenti S_5 - S_6 dei canali K_v . Mancando il sensore di voltaggio, tali subunità formano canali intrinsecamente voltaggio-indipendenti; a tale gruppo, formato da almeno sette geni (K_{IR1} - K_{IR7}), appartengono i canali definiti come rettificatori entranti, sia costitutivamente attivati che regolati da G-proteine; 3. la famiglia dei canali a 4 segmenti transmembrana (4TM), formata da subunità codificate da almeno 15 geni distinti (K_{2P1} - K_{2P17}). Mentre le subunità del primo e secondo gruppo formano un canale al K^+ completo assemblandosi in tetrameri, quelle del terzo gruppo sono probabilmente dimeriche. Tale classificazione, per quanto semplicistica in taluni aspetti, verrà mantenuta nei paragrafi successivi, dove verranno descritte quelle famiglie di canali al K^+ che rivestono di maggiore rilevanza farmacologica attuale o potenziale. Tuttavia, pare opportuno ricordare che questi tre gruppi non esauriscono l'eterogeneità strutturale e funzionale dei canali al K^+ ; infatti, alcuni canali al K^+ la cui attività dipende dai livelli di Ca^{2+} intracellulari sono formati dall'assemblaggio di subunità con sette segmenti transmembrana (canali BK, vedi oltre), presentando infatti un segmento transmembrana extra all'N-terminale definito S_0 .

Sottofamiglie di canali al K^+ a 2 segmenti transmembrana (2 TM)

I canali K_{ATP} sono cruciali nel pancreas endocrino, nel cuore, nei vasi e nel sistema nervoso centrale

I canali K_{ATP} sono ampiamente espressi in diversi tessuti; sono particolarmente abbondanti nelle cellule β pancreatiche, nelle cellule muscolari scheletriche, nei cardiomiociti e, sebbene in quantità minori, nel muscolo liscio e nel cervello. Il ruolo fisiologico dei canali K_{ATP} è quello di accoppiare l'attività elettrica con l'attività metabolica delle cellule in cui sono espressi. Infatti, l'aumento delle concentrazioni citoplasmatiche di ATP

che consegue a un'aumentata disponibilità extracellulare e utilizzazione intracellulare del glucosio determina una chiusura di tali canali, con conseguente depolarizzazione cellulare fino a un potenziale a cui si aprono i canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti che innescano, nei diversi tipi cellulari, la contrazione, il rilascio ormonale o la liberazione neurotrasmettitoriale. I canali K_{ATP} sono formati dall'assemblaggio di subunità appartenenti alla famiglia dei $\text{K}_{\text{IR}6.1}$ o $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ con subunità accessorie appartenenti alla famiglia delle proteine ABC (*ATP-Binding Cassette*) e caratterizzate dalla presenza di due domini di legame per nucleotidi. Nei canali K_{ATP} , tali proteine accessorie vengono chiamate SUR, per sottolineare che esse costituiscono il recettore per le sulfoniluree, farmaci in grado di bloccare specificamente tale classe di canali. Ciascuna subunità SUR è organizzata topologicamente in 13 o più segmenti TM e presenta omologia di sequenza primaria con il canale per il cloro CFTR (vedi oltre). La struttura completa del canale K_{ATP} consiste di 4 monomeri a 2 TM che formano il poro e altri 4 monomeri SUR intorno ai precedenti (Figura 22.8). Nei diversi tessuti esistono tipi di canali K_{ATP} distinti, composti da un variabile assemblaggio di subunità K_{IR} (6.1 o 6.2) con recettori SUR (SUR1, SUR2A, SUR2B) (Tabella 22.6). Infatti, nelle cellule β pancreatiche, il canale K_{ATP} è principalmente costituito dall'assemblaggio di subunità $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ e SUR1; nel muscolo cardiaco invece il canale K_{ATP} è principalmente costituito dall'assemblaggio di subunità $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ e SUR2A, laddove l'accoppiamento di subunità $\text{K}_{\text{IR}6.1}$ o $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ con SUR2B sembra sottendere il canale K_{ATP} delle cellule muscolari lisce vascolari e non, rispettivamente. Infine, nel cervello, è possibile riscontrare quasi tutte le possibili combinazioni precedentemente menzionate.

I canali K_{ATP} sono il bersaglio molecolare degli ipoglicemizzanti orali della classe delle sulfoniluree e delle glinidi

Le sulfoniluree sono farmaci ipoglicemizzanti orali ampiamente utilizzati per il trattamento del diabete di tipo II (non insulino-dipendente) (vedi anche Capitolo 31). Vengono distinte in due generazioni (1 generazione: tolbutamide, clorpropamide, tolazamide, acetoesimide ecc.; 2 generazione: gliburide o glibenclamide, glipizide, gliciclazide, glicazide, gliquidone, glisolamide, glimepiride ecc.); sebbene l'efficacia ipoglicemizzante delle molecole di entrambe le generazioni sia equivalente, quelle di seconda generazione sono generalmente più potenti. Alcuni nuovi composti sono derivati non più benzensulfonici bensì dell'acido benzoico o 3-fenilpropionico (meglitinide, repaglinide, nateglinide; collettivamente definite come glinidi). Il meccanismo d'azione sia delle sulfoniluree che delle glinidi è basato sul blocco dei canali K_{ATP} delle cellule β pancreatiche, che mima gli effetti di un aumento del glucosio extracellulare e dell'ATP intracellulare (Figura 22.8). La chiusura dei canali K_{ATP} provoca depolarizzazione della cellula β , attivazione dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, e innesco del rilascio di insulina. Pertanto, perché tali molecole siano efficaci, è necessario che il pancreas mantenga la sua capacità di

secernere insulina; esse sono dunque inefficaci nel diabete insulino-dipendente. In generale, i recettori SUR1 sembrano essere generalmente più sensibili rispetto a quelli SUR2 all'azione dei farmaci ipoglicemizzanti orali della classe delle sulfoniluree e a quella delle glinidi. Ciò porrebbe le basi molecolari per la relativa mancanza di effetti extra-pancreatici osservata nella pratica clinica con tali farmaci. Inoltre, differenze nelle cinetiche e modalità di interazione con i canali K_{ATP} potrebbero essere responsabili delle differenze nelle proprietà farmacologiche dei diversi farmaci insulintropici; infatti, laddove la glibenclamide o la repaglinide presentano un effetto molto prolungato sulla secrezione di insulina che riduce la capacità della cellula β pancreatiche di rispondere alle normali variazioni della glicemia, la nateglinide sembra inibire i canali K_{ATP} con maggiore rapidità, minore durata, e in maniera glucosio-dipendente. Questo ridurrebbe il rischio di ipoglicemia e di danno pancreatico associato all'utilizzo di molecole a maggiore durata d'azione, e renderebbe ragione dell'utilizzo della nateglinide prevalentemente nell'iperglicemia postprandiale.

Infine, mutazioni inattivanti in $\text{K}_{\text{IR}6.1}$ o SUR1 sono responsabili dell'iperinsulinismo familiare (PHHI), in cui il canale K_{ATP} è costantemente inattivo e non gioca il suo ruolo inibitorio nel rilascio di insulina; viceversa, mutazioni attivanti negli stessi geni sono state associate a condizioni di diabete neonatale transitorio o persistente (Tabella 22.1).

I canali K_{ATP} sono anche il principale bersaglio d'azione di molti Potassium Channel Openers (KCO)

Sotto il nome di KCO sono comprese varie classi di agenti farmacologici dalle strutture chimiche assai differenti (Tabella 22.7), alcuni dei quali possiedono anche altre azioni oltre a quella di attivazione dei canali al K^+ . Tra i KCO che hanno come bersaglio primario i canali K_{ATP} (detti anche $\text{K}_{\text{ATP}}\text{CO}$), il pinacidil, il cromakalim, e il nicorandil sono vasodilatatori che mostrano una netta preferenza per i K_{ATP} contenenti subunità SUR2, mentre hanno effetti minimi a livello di SUR1. Ciò spiegherebbe l'incapacità di tali molecole di modificare la funzione delle cellule β pancreatiche; viceversa, il diazossido, non mostrando selettività d'azione tra SUR1 e SUR2, è un potente attivatore anche dei canali K_{ATP} pancreatici; ciò renderebbe ragione, oltre dell'attività vasodilatante, anche dell'intensa azione iperglicemizzante esercitata da tale molecola.

L'azione farmacologica dei $\text{K}_{\text{ATP}}\text{CO}$ di più promettente interesse terapeutico è quella ipotensivante diretta, conseguente all'effetto miorelaxante dovuto all'apertura dei canali al K^+ e all'iperpolarizzazione delle miocellule lisce vascolari che riduce l'ingresso di Ca^{2+} attraverso i canali voltaggio-dipendenti e l'innescamento del processo di contrazione. Il cromakalim e il suo isomero più attivo, levromakalim, rilassano anche la muscolatura tracheale, e sono stati studiati come broncodilatatori e antiasmatici: tuttavia il loro sviluppo per questa indicazione sembra limitato dall'insorgenza, alle dosi terapeuticamente efficaci, di emicrania probabilmente dovuta a vasodilatazione cerebrale. Il minoxidil solfato è utilizzato come va-

sodilatatore nella terapia dell'ipertensione, generalmente in associazione a diuretici e β -bloccanti; un'indicazione caratteristica del minoxidil in formulazione topica è l'alopecia, in quanto, agendo a livello del cuoio capelluto, favorirebbe il flusso sanguigno e la ricrescita dei capelli. Un altro capitolo importante è quello degli effetti cardiaci dei $K_{ATP}CO$. Essi accelerano la ripolarizzazione del potenziale d'azione e ne accorciano la durata. Tale effetto può essere favorevole per certi tipi di aritmia, ma può essere aritmogeno in altri casi. In situazioni di ischemia miocardica, tali farmaci ridurrebbero l'eccitabilità cellulare, limitando il consumo metabolico e di conseguenza la severità del danno tissutale. Tale proprietà ha forti

potenzialità anche a livello del SNC, dove i $K_{ATP}CO$ sono allo studio come antiepilettici e neuroprotettori, soprattutto in seguito alla scoperta che i K_{ATP} giocano un ruolo cruciale nel fenomeno del pre-condizionamento ischemico. Tuttavia, un problema che ne ha limitato fino a oggi lo sviluppo clinico e l'approdo terapeutico è la scarsa selettività tessutale di tali molecole. Ad esempio, non è stato possibile con questi agenti ottenere gli effetti a livello cardiaco e del SNC in assenza di una contemporanea potente vasodilatazione. Bisognerà dunque attendere nuovi agenti più selettivi nei riguardi delle varie isoforme di canali K_{ATP} per esplorarne appieno il potenziale terapeutico. Infine, va ricordato come evidenze recenti

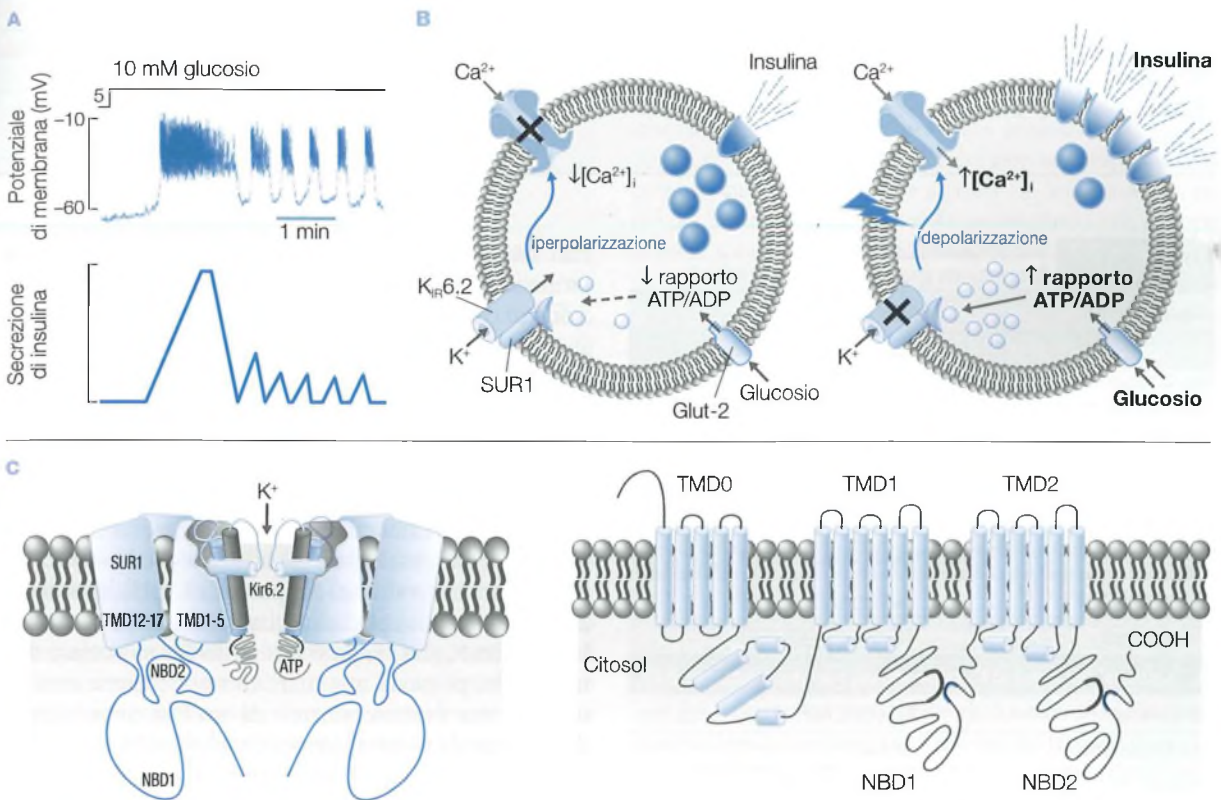


FIGURA 22.8 Ruolo fisiologico, struttura e determinanti molecolari dei canali K_{ATP} presenti nelle cellule β insulina-secernti pancreatiche. **A.** Le cellule β fungono da sensori per il glucosio; quando le concentrazioni extracellulari di glucosio aumentano (da 5 a 10 mM), le cellule β si depolarizzano e aumentano la secrezione di insulina. **B.** Ruolo dei canali K_{ATP} nella regolazione glucosio-dipendente della secrezione di insulina. In condizioni di basso glucosio (5 mM), il rapporto ATP/ADP è basso, per cui i canali K_{ATP} sono aperti e la cellula è iperpolarizzata. Pertanto, i canali voltaggio-dipendenti del Ca^{2+} , attivabili dalla depolarizzazione, sono inattivi e la $[Ca^{2+}]_i$ è bassa, con scarsa liberazione di insulina. Quando, dopo il pasto, le concentrazioni plasmatiche di glucosio aumentano (10 mM), il rapporto ATP/ADP aumenta, determinando la chiusura dei canali K_{ATP} , cui consegue una depolarizzazione di membrana che attiva i canali voltaggio-dipendenti del Ca^{2+} e aumenta la $[Ca^{2+}]_i$, con conseguente aumento della liberazione di insulina. Mutazioni attivanti nel canale K_{ATP} (sia in SUR1 che in $K_{IR}6.2$, vedi Tabella 22.1), che lo rendono insensibile all'inibizione da alti rapporti ATP/ADP, causano una cronica iperpolarizzazione, con conseguente soppressione della secrezione insulinica anche quando le cellule β sono esposte ad alte concentrazioni di glucosio; tale situazione è responsabile di diabete neonatale. Viceversa, mutazioni inattivanti nei geni che codificano sia SUR1 che $K_{IR}6.2$, come si verifica nella neisidioblastosi, causano un'ipofunzione del canale K_{ATP} , con conseguente cronica depolarizzazione della cellula β ed iperinsulinemia, pur in condizioni di basso glucosio (vedi Tabella 22.1). **C.** Modelli che illustrano la struttura etero-ottamerica del canale K_{ATP} pancreatico. Nel canale completo (pannello di sinistra), quattro molecole di $K_{IR}6.2$ sono racchiuse all'interno di quattro proteine SUR1. Sono evidenziati i domini di legame dei nucleotidi (NBD1 e NBD2) di SUR1 (per chiarezza di schema ne sono state mostrate solo 2), il sito di legame dell'ATP su $K_{IR}6.2$, e gli ioni K^+ che attraversano il filtro di selettività. Nel pannello di destra, è mostrato il modello topologico della subunità SUR1, con tre domini transmembrana (TMD0-TMD2) e due domini di legame dei nucleotidi (NBD1 e NBD2). (Da: Bennett K et al. Pancreatic β -cell K_{ATP} channels: hypoglycaemia and hyperglycaemia. Rev Endocr Metab Disord 2010;11:157-63, modificata)

TABELLA 22.6 Classificazione e proprietà dei principali canali del K⁺ a due segmenti transmembrana

Sottofamiglie (simbolo del gene)	K _{IR} 1.1 (KCNJ1, ROMK1)	K _{IR} 2.1 (KCNJ2, IRK1)	K _{IR} 3.1 (KCNJ3, GIRK1)	K _{IR} 6.1 (KCNJ8)
Tessuto	Corticale e midollare renale, milza	SNC, cuore, muscolo scheletrico, cellule endoteliali, macrofagi	SNC, atrio	Ubiquitario, specialmente nel muscolo liscio
Bloccanti	Ba, Cs (non selettivi)	Ba, Cs (non selettivi); Mg ²⁺ , poliammine	Ba, Cs (non selettivi); Mg ²⁺ , poliammine	Sulfoniluree (tramite recettori SUR associati)
Attivatori			G-proteine (via βγ); fosfatidilinositolo bis-fosfato (PIP ₂)	Nucleosidi difosfati; KCOs
Cromosoma	11q24	17q23.1-24.2	3q32	12p11.23
Fisiologia	Debole rettificatore entrante; trasporto di ioni a livello renale	Forte rettificatore entrante; Mantenimento di V _{REST} ; ripolarizzazione del potenziale d'azione cardiaco	Iperpolarizzazione recettore-dipendente di V _{REST} ; frequenza cardiaca, inibizione attività elettrica neuronale	Insieme a SUR2B forma il canale del K ⁺ ATP-dipendente muscolare liscio del tessuto vascolare, coinvolto nella regolazione del tono vascolare
Farmacologia, bersaglio				SUR2B è bersaglio per antipertensivi e coronaro-dilatatori
Canalopatie	Sindrome di Bartter	Sindrome di Andersen		

TABELLA 22.7 Classificazione dei farmaci "potassium channel openers" (KCOs)

Classe chimica	Composti
1. "Openers" dei canali al K⁺ ATP-sensibili	
Benzopirani	Cromakalim, levcromakalim
Cianoguanidine	Pinacidil, P1075
Tioformamidi	Aprikalim, RP49356
Pirimidine	Minoxidil solfato, LP-805
2. Farmaci che attivano sia i canali al K⁺ ATP-sensibili sia la guanilato ciclastasi	
Benzotiadiazine	Diazossido
Nicotinamidi	Nicorandil, KRN2391
3. "Openers" dei canali al K⁺ calcio-attivati a larga conduttanza (BK)	
Benzimidazoli	NS1619, NS004
Imidazopirazine	SCA40
Derivati terpenici	DHS-1, Maxikdiolo
Fluoro-ossindolici	BMS-204352 (attiva anche membri della famiglia KCNQ)
4. "Openers" di canali voltaggio-dipendenti del K⁺ di tipo KCNQ	
Derivati dell'acido carbamico	Retigabina, flupirtina
Benzodiazepine	R-L3
Fluoro-ossindolici	BMS-204352
Derivati dell'acrilamide	S1, S2
Fenamati	Diclofenac, meclofen
Benzamidi	ICA-27243

sottolineino un rilevante ruolo di canali K_{ATP} localizzati a livello della membrana mitocondriale interna (mitoK_{ATP}) nei processi di citoprotezione (produzione di radicali liberi; liberazione di citocromo c, attivazione caspasi ecc.) associati al pre-condizionamento ischemico; sebbene il profilo molecolare e farmacologico di tali canali

non sia ancora delineato, è possibile che alcune azioni farmacologiche dei K_{ATP}CO siano attribuibili all'attivazione di canali mitoK_{ATP}.

Altri canali al K⁺ a 2 TM includono canali variamente regolati da molecole intracellulari (G-proteine, Mg²⁺, poliammine, protoni)

Alla famiglia K_{IR}1.x appartiene il canale cosiddetto ROMK (il primo della famiglia a 2 segmenti a essere scoperto) che è caratterizzato da una debole rettificazione entrante e che, analogamente alle famiglie K_{IR}4.x, 5.x e 7.x, sembra coinvolto nel trasporto di K⁺ pH-dipendente a livello di cellule epiteliali e gliali (Tabella 22.6). Invece la famiglia K_{IR}2.x, espressa a livello sia muscolare che neuronale, possiede una marcata rettificazione entrante, conferita estrinsecamente da un blocco voltaggio-dipendente da parte di cationi citoplasmatici quali Mg²⁺ e/o poliammine (spermina e spermidina). Tali cationi intracellulari, legandosi a siti localizzati a livello del TM 2 e più distalmente nel C-terminale, sono in grado di ostruire la bocca intracellulare del canale, impedendone l'accesso agli ioni K⁺ intracellulari; il loro legame al canale aumenta con la depolarizzazione della membrana, determinando pertanto al caratteristica rettificazione entrante della relazione corrente-voltaggio (Figura 22.3). Si deve all'espressione di canali della famiglia K_{IR}2.x l'elevata conduttanza al K⁺ presente nel tessuto muscolare a riposo. Alla famiglia K_{IR}3.x (detta GIRK da *G-protein-activated Inward Rectifier K channels*) appartengono quei canali che sono attivati dalle G-proteine (in particolare dalle subunità βγ che si legano a domini citoplasmatici formati dalle estremità N- e C-terminali) innescate dalla stimolazione di numerosi recettori per neurotrasmettitori. I canali GIRK hanno proprietà rettificanti entranti e sono espressi soprattutto nel sistema nervoso e nel cuore dove esplicano una funzione inibitoria. La loro attivazione conseguente all'occupazione dei recettori muscarinici

**K_v6.2
(KCNJ11)**

Sistema nervoso, cuore, muscolatura scheletrica, pancreas

ATP; sulfoniluree (tramite recettori SUR associati)

MgADP; KCOs

11p15.1Insieme a SUR1 (e SUR2A/B) forma il "classico" canale del K⁺ ATP-dipendente, coinvolto nella regolazione della secrezione d'insulina, come sensore di ossigeno e glucosio nel SN, e nella citoprotezione e preconditionamento ischemico

SUR1 è il bersaglio di sulfoniluree e KCOs

Mutazioni inattivanti: ipoglicemia iperinsulinemica persistente dell'infanzia (PHHI); mutazioni attivanti: diabete neonatale persistente o transiente (PNDM, TNDM)

sottotipo M₂ media le azioni inibitorie esercitate dalla neurotrasmissione parasimpatica vagale a livello cardiaco. Oltre ai recettori M₂ cardiaci, i recettori del SNC accoppiati ai canali GIRK comprendono, tra gli altri, gli A₁ adenosinici, μ e δ oppioidi, GABA_B, α_2 noradrenergici, D₂ dopaminergici, 5-HT_{1A} serotoninergici, e i recettori per la somatostatina. Spesso i complessi funzionali recettore-G proteina-canale GIRK sono presenti a livello delle terminazioni presinaptiche dove regolano in senso inibitorio il rilascio di neurotrasmettitore. Tale proprietà è un potenziale bersaglio farmacologico, ad esempio in situazioni di eccessivo e dannoso rilascio di amminoacidi eccitatori in seguito a insulti di natura ischemica o traumatica. Sebbene, al momento attuale, non vi siano in commercio farmaci che riconoscano come proprio meccanismo principale d'azione l'interferenza diretta con tale classe di canali, è evidente il loro coinvolgimento nel determinismo delle azioni farmacologiche che conseguono all'attivazione o al blocco dei recettori precedentemente descritti.

I canali a 4 segmenti (4TM) generano correnti voltaggio-indipendenti attive in condizioni di riposo ("background K⁺ channels")

Ciascuna subunità appartenente a questa classe (se ne conoscono al momento attuale oltre 13, denominate da K_{2p1} a K_{v2p17}) presenta una topologia caratteristica, con quattro segmenti TM e due regioni del poro: somigliano pertanto a due subunità dei canali a 2 segmenti TM unite covalentemente in tandem; il canale completo è un dimero di tali subunità. I canali di questa classe sono tutti voltaggio-indipendenti, ma possono essere attivati da acidi grassi e stress osmotico (TRAAK, TREK), alcalosi (TALK), o inibiti dall'acidosi (TASK). Tutti i tessuti esaminati esprimono canali a 4 TM; si ritiene che essi contribuiscano all'elevata conduttanza al K⁺ osservata in condizioni di riposo nella maggior parte dei tipi cellulari.

In particolare, essi hanno assunto una notevole rilevanza farmacologica nel sistema nervoso centrale, dal momento che alcuni di essi possono essere specificamente attivati da farmaci anestetici volatili (cloroformio, alotano, isoflurano ecc.), fornendo una base molecolare alle azioni farmacologiche esercitate da tali composti. Attivazione di tali conduttanze a riposo determina iperpolarizzazione neuronale, soppressione del firing e inibizione della trasmissione sinaptica. Meccanismo analogo potrebbe anche essere esercitato dal farmaco riluzolo, un composto ad attività antischemica, anticonvulsivante, e sedativa utilizzato nel trattamento della sclerosi laterale amiotrofica, sebbene l'interazione anche con altri canali possa spiegare alcune azioni farmacologiche di tale composto.

Sottofamiglie di canali a 6 TM

Sebbene i membri di tali famiglie abbiano proprietà molto diverse fra loro dal punto di vista biofisico, farmacologico e di distribuzione tessutale, essi mostrano tutti la comune proprietà di essere attivati da depolarizzazione del potenziale di membrana. Appartengono a tale gruppo diverse sottofamiglie geniche (da K_v1 a K_v12), ciascuna che comprende diversi membri; sebbene le diverse sottofamiglie abbiano ruoli fisiopatologici chiaramente definiti, descriveremo qui solo quelle nelle quali le conoscenze farmacologiche siano sufficientemente sviluppate da poterle immaginare anche un ruolo farmaco-terapeutico (Figura 22.4; Tabella 22.8).

I canali del tipo "shaker" sono importanti nell'eccitabilità

I canali del tipo di "shaker" (K_v1, così denominati in quanto originalmente scoperti nell'omonimo mutante di *Drosophila*) hanno la funzione di ripolarizzare la cellula dopo una depolarizzazione rapida. Questo tipo di subunità sottende sia alle correnti cosiddette "delayed rectifier" (I_{DR}) che sono prive di fenomeni di inattivazione a breve termine, sia a quelle di "tipo A" (I_A), che presentano cinetiche di attivazione e inattivazione assai più rapide (Tabella 22.8). A causa della forte voltaggio-dipendenza del processo di inattivazione, tali canali sono disponibili ad attivarsi solo se la cellula proviene da uno stato iperpolarizzato, ad esempio dalla cosiddetta fase di post-iperpolarizzazione (*AfterHyperPolarization*, AHP) che segue a uno o più potenziali d'azione. Quando si hanno treni di potenziali d'azione, le AHP intervengono nell'intervallo tra potenziali opponendosi al raggiungimento del valore soglia e determinando un ritardo nell'insorgenza del potenziale successivo: ciò serve a spaziare temporalmente il messaggio codificato nel treno di potenziali d'azione. Sebbene importanti dal punto di vista storico (furono i primi geni codificanti per canali del K⁺ a essere identificati sia in *Drosophila* che nei mammiferi), i canali della famiglia shaker, così come Shab (K_v2), Shal (K_v3) e Shaw (K_v4) rivestono una limitata importanza farmacoterapeutica; la 4-aminopiridina (4-AP) è un farmaco dotato di una relativa selettività nel blocco dei canali I_A localizzati a livello degli assoni

TABELLA 22.8 Classificazione e proprietà dei principali canali al K⁺ voltaggio-dipendenti

Sottofamiglie, altri nomi	K _v 1.1, KCNA1	K _v 1.4, KCNA4	K _v 1.5	K _v 3.4, KCNC4	K _v 4.3, KCND3	K _v 7.1, KCNQ1	K _v 7.2, KCNQ2	K _v 11.1, KCNH2, ERG1
Subunità accessorie	β-subunità	β-subunità, KCNB1	β-subunità K _v β1.2, K _v β1.3 e K _v β2.1	KCNE3	KCHIP, KCND2	KCNE1, KCNE3	K _v 7.3 (KCNQ3), KCNE3	KCNE2
Corrente macroscopica	I _{DR}	I _A	I _{Kur}	I _A	I _{to}	I _{Ks}	I _M	I _{Kr}
Tessuto	CNS, muscolo	CNS	Cuore (atrio), muscolo liscio, glia	SNC, muscolo scheletrico	Cuore, muscolo liscio, SNC	Cuore, orecchio, pancreas	SNC, SNP	Cuore, neuroblastoma
Bloccanti	TEA, DTX	4-AP, TEA	Vernakalant e AVE-0118	TEA, BDS-1	Bupivacaina, PaTx1	Cromanolol, azimilide, linopirdina, XE-991	Linopirdina, XE-991	E-4031, astemizolo, dofetilide, aloperidolo (vedi Tab. 22.9)
Attivatori						v. Tab. 22.7	v. Tab. 22.7	
Conduttanza di singolo canale	10pS	5pS	11pS	14pS	5pS	1.8pS	6-8pS	2pS
Fisiologia	Ripolarizzazione del potenziale d'azione	Ripolarizzazione del potenziale d'azione	Corrente ultrarapida di ripolarizzazione atriale	Ripolarizzazione del potenziale d'azione	Ripolarizzazione del potenziale d'azione	Ripolarizzazione cardiaca	Eccitabilità neuronale	Ripolarizzazione cardiaca, adattamento della frequenza di scarica neuronale
Canalopatie	Atassia episodica di tipo 1			Paralisi periodica (KCNE3)		LQTS-1; SQT5	BFNC	LQTS-2; SQT5

e dei terminali nervosi motori colinergici, con effetti di blocco voltaggio- e tempo-dipendenti. La 3,4-diaminopiridina, un derivato più liposolubile della 4-AP dotato, rispetto a questa, di migliori proprietà farmacocinetiche, prolungando la depolarizzazione e stimolando il rilascio di neurotrasmettitori dai terminali nervosi, può essere utilizzata in alcune patologie paralitiche miasteniformi (sindrome di Lambert-Eaton) e nella sclerosi multipla. I canali K_v1.5 rappresentano la base molecolare della corrente di ripolarizzazione ultrarapida (I_{Kur}), una corrente cardiaca presente a livello atriale ma scarsamente espressa a livello ventricolare. Date le potenziali implicazioni di I_{Kur} nell'aritmogenesi, essa è oggetto di numerosi studi farmacologici; infatti, farmaci bloccanti di K_v1.5, quali il vernakalant e l'AVE-0118, sono in corso di attiva sperimentazione come antiaritmici "atrio-selettivi".

I canali della famiglia EAG sono cruciali nella funzione cardiaca e nervosa

I canali della famiglia EAG (per *ether-a-go-go*, che è il nome del mutante di *Drosophila* dove è stato scoperto) sono stati suddivisi in tre sottofamiglie geniche: *eag* (K_v10.1 o KCNH1), *erg* (K_v11.1 o KCNH2) ed *elk* (K_v12.1 o KCNH4). Tali sottofamiglie hanno un'omologia amminoacidica di circa il 50% e un'omologia con la famiglia shaker dell'ordine del 22%. I canali Kv10.1 hanno due peculiarità, quella di essere chiusi da alte [Ca²⁺]_i in modo del tutto opposto a quelli dei canali attivati da [Ca²⁺]_i, e quella di mostrare un marcato ritardo nell'attivazione se il potenziale di riposo è molto negativo. Sebbene

il ruolo dei canali K_v10.1 rimanga ancora da definire, recenti evidenze suggeriscono che essi vengano espressi ectopicamente in neoplasie originanti da diversi tessuti, lasciando intravedere un loro ruolo nel controllo del ciclo e della proliferazione cellulare (tale proprietà sembra anche condivisa dai canali della famiglia K_v11.1).

I canali della famiglia K_v11 (anche denominati *erg* o *eag-related gene*, in quanto isolati sfruttando la loro omologia di sequenza con i canali *eag*) sono caratterizzati da un processo di inattivazione molto più rapido di quello di attivazione a potenziali depolarizzati; pertanto tali canali, pur essendo intrinsecamente voltaggio-dipendenti e attivati dalla depolarizzazione, mostrano correnti uscenti piccole a potenziali depolarizzati, comportandosi pertanto da rettificatori entranti. Tali canali sono oggi molto studiati per le loro implicazioni cardiache; essi infatti rappresentano la base molecolare della componente rapida del processo di ripolarizzazione del potenziale d'azione cardiaco a livello ventricolare (I_{Kr}). Viceversa, complessi eterotetrameriche composti da subunità principali codificate dal gene KCNQ1/K_v7.1 (vedi oltre) e da proteine accessorie (KCNE1) sottendono alla componente lenta del processo di ripolarizzazione del potenziale d'azione cardiaco ventricolare (I_{Ks}); in cellule nervose è stata dimostrata l'importanza dei canali della famiglia K_v11 nella regolazione della frequenza e dell'accomodazione dei treni di potenziale d'azione.

Canali K_v11.1: bersaglio per azioni antiaritmiche o proaritmiche di farmaci

La classificazione dei farmaci antiaritmici proposta nel 1984 da Vaughan-Williams e tuttora largamente utilizzata include tra gli antiaritmici di classe III le molecole caratteristicamente in grado di prolungare la durata del potenziale d'azione, e di conseguenza il periodo refrattario, nei miociti cardiaci (Tabella 22.4). Tale azione è specificamente riconducibile a un blocco dei canali al K^+ che determinano la ripolarizzazione cardiaca durante la fase 3 (I_{Kr} e I_{Ks}). Tra i farmaci di classe III, ricordiamo l'amiodarone, il clofilio, la dofetilide, l'*N*-acetilprocainamide e il sotalolo. Il sotalolo e l'amiodarone sono stati i primi antiaritmici di classe III introdotti in terapia; essi tuttavia possiedono un profilo farmacologico complesso che combina al blocco dei canali al K^+ il blocco della stimolazione simpatica cardiaca (azione tipica degli antiaritmici di classe II). Negli anni successivi, venne pertanto fatto un notevole sforzo per identificare nuove molecole che fossero selettivamente in grado di esercitare un'azione di classe III pura; tuttavia, composti come la dofetilide e il *d*-sotalolo, che inibiscono selettivamente I_{Kr} , non hanno mostrato effetti favorevoli sulla mortalità da aritmie. Inoltre, intorno alla metà degli anni 90 è emerso come mutazioni di questi canali (sia I_{Kr} che I_{Ks}) possono essere alla base di gravi disturbi cardiaci (Tabella 22.1). Quasi simultaneamente venne inoltre dimostrato che farmaci appartenenti a diverse categorie terapeutiche (Tabella 22.9), bloccando I_{Kr} sottesa dai canali della famiglia K_v11 ($K_v11.1$ in particolare, l'unico membro di questa famiglia espresso in misura significativa a livello del tessuto miocardico), causano un allungamento dell'intervallo QT all'ECG, e predispongono i pazienti che li assumono all'insorgenza di un'aritmia ventricolare polimorfa denominata "torsione di punta".

Nel **CD**: Approfondimento 22.6 (*La sindrome del QT lungo indotta da farmaci*) vengono trattati alcuni aspetti patogenetici dell'LQTS, particolarmente in riferimento alle ragioni strutturali responsabili del blocco selettivo di I_{Kr} da parte di farmaci "torsadogenici". Alla luce di tali osservazioni, la ricerca di molecole "selettive" per il blocco di I_{Kr} o I_{Ks} ha subito un notevole rallentamento. Ciò nonostante, si sono recentemente resi disponibili nuovi farmaci con tale meccanismo d'azione; il dronedarone è un antiaritmico di classe III orale strutturalmente simile all'amiodarone, avendo come questi una struttura benzofuranica ma risultando privo dello iodio. Il dronedarone ha come indicazioni il trattamento dei pazienti adulti clinicamente stabili con anamnesi di fibrillazione atriale, con fibrillazione atriale non permanente in corso, per prevenire una recidiva di fibrillazione atriale, o per diminuire la frequenza ventricolare. Altri farmaci che bloccano contemporaneamente più conduttanze al K^+ sono il tedisamil, che ha effetti su I_{Kr} , I_{to} (I_A), K_{ATP} , e $BK(Ca)$, e l'azimilide, che blocca sia I_{Kr} che I_{Ks} ; infine, il BRL-32872 è un nuovo farmaco antiaritmico con proprietà miste avendo azioni sia di classe III che IV.

I canali K_v7 controllano la ripolarizzazione cardiaca, l'eccitabilità neuronale e la trasduzione sensoriale

TABELLA 22.9 Esempi di farmaci associati a segnalazioni di allungamento del QT o insorgenza di torsade de pointes (TdP)

Antiaritmici	Classe Ia: chinidina, procainamide, disopiramide Classe III: N-acetilprocainamide, amiodarone, sotalolo
Cardiovascolari (esclusi gli antiaritmici in senso stretto)	Bepiridil, isoprenalina, ketanserina, mibefradil
Antipsicotici	Aloperidolo, clorpromazina, droperidolo, pimozide, quetiapina, sertindolo (ritirato), tioridazina (ritirata)
Antidepressivi	Amitriptilina, desipramina, doxepin
Antimaniacali	Litio
Antistaminici	Astemizolo (ritirato), terfenadina (ritirato), difenidramina, idrossizina
Macrolidi	Claritromicina, eritromicina, spiramicina
Antimalarici	Alofantrina, chinina
Antimicotici	Ketoconazolo
Chinoloni	Grepafloxacin (ritirata), levofloxacin, sparfloxacin
Antiemetici	Ondansetron, granisetron
Immunosoppressori	Tacrolimus (FK506)
Antimuscarinici	Terodilina
Vari	Cisapride (ritirata), pentamidina, alofantrina, antimoniali pentavalenti, probucolo, trimetoprim-sulfametossazolo, cocaina, arsenico, insetticidi organofosforici

(Da: Poluzzi E, De Ponti F, Montanaro N. Prolungamento dell'intervallo QT dell'elettrocardiogramma e rischio di aritmie ventricolari associate all'uso di farmaci non antiaritmici. <http://www.farmacovigilanza.org/corsi/poluzzi/cap2>, modificata)

I cinque membri noti di tale famiglia ($KCNQ1-5$; $K_v7.1-5$), formano canali del K^+ che sono tutti caratterizzati dall'essere attivati dalla depolarizzazione, dal presentare cinetiche di attivazione e deattivazione estremamente lente, e dall'assenza di inattivazione. Tali subunità hanno ciascuna una peculiare distribuzione tessutale e rilevanza fisiopatologica e farmacologica (Tabella 22.8). Le subunità $K_v7.1$ sono espresse a livello cardiaco dove, congiuntamente ad alcune subunità accessorie KCNE1, sottendono alla componente lenta della corrente di ripolarizzazione ventricolare (I_{Ks}). Mutazioni in tali canali sono responsabili di una delle forme geneticamente determinate di sindrome del QT lungo (Tabella 22.1); farmaci attivatori di tali canali (nuove benzodiazepine tipo R-L3) sono attualmente in studio come antiaritmici. Viceversa, le subunità $K_v7.2$, $K_v7.3$, $K_v7.4$ e $K_v7.5$ sono espresse prevalentemente in cellule nervose sia periferiche che centrali. Mentre $K_v7.4$ sembra essere principalmente espresso a livello dell'orecchio interno e delle vie uditive centrali, l'assemblaggio eteromero di subunità $K_v7.2$ e $K_v7.3$ (e, forse, $K_v7.5$) è responsabile della formazione della corrente M (I_{KM}), una corrente implicata principalmente nel controllo della frequenza di scarica in numerose popolazioni neuronali così denominata in

quanto soppressa dall'attivazione dei recettori muscarinici accoppiati a $G_{q/11}$. Svariati recettori sono accoppiati in senso inibitorio o, più raramente, stimolatorio a tale corrente. Il ruolo farmacologico della I_{KM} è duplice; farmaci in grado di bloccare tale corrente, determinando una depolarizzazione neuronale, stimolano la liberazione di neurotrasmettitori. Tale meccanismo d'azione è proprio dei farmaci "stimolanti cognitivi" (o "cognition enhancers" quali la linopirdina o suoi derivati a struttura antracenonica quali l'XE-991), in quanto si ritiene che essi possano essere utili in malattie neurodegenerative croniche caratterizzate da deficit neurotrasmettitoriali, quali il morbo di Alzheimer. D'altra parte, farmaci attivatori di I_{KM} , iperpolarizzando la membrana neuronale, inibiscono l'attività elettrica; la retigabina è un farmaco che, agendo con tale meccanismo, rappresenta il capostipite di una nuova classe di KCO attivi specificamente su canali di tipo K_v7 neuronali, che si sono distinti in sperimentazioni precliniche come promettenti farmaci antiepilettici. Dato l'importante ruolo funzionale di I_{KM} anche nel controllo della percezione sensoriale dolorifica a livello dei gangli delle radici dorsali, un'ulteriore applicazione terapeutica dei farmaci attivatori di I_{KM} sembra essere nella terapia del dolore neuropatico; a tale proposito, va infatti menzionato come la retigabina sia un analogo strutturale della flupirtina, una molecola anch'essa in grado di attivare i canali di tipo K_v7 neuronali e già in commercio per il trattamento di diverse forme di dolore (post-traumatico, in odontostomatologia, post-operatorio, mal di testa, dismenorrea). Infine, è stato recentemente dimostrato come canali formati dalle subunità $K_v7.4$ e $K_v7.5$ siano espressi anche a

livello della muscolatura liscia vascolare e viscerale. Nei vasi, l'attivazione di tali canali determina un importante effetto vasodilatatore; pertanto, farmaci attivatori selettivi di tali canali potrebbero avere utilizzo come farmaci antipertensivi.

Altre famiglie a 6 o 7 TM: i canali al K^+ Ca^{2+} -dipendenti

**I canali al K^+ Ca^{2+} -dipendenti (K_{Ca})
sono importanti nell'adattamento
della frequenza dei potenziali d'azione**

I K_{Ca} sono canali presenti in svariati tipi cellulari e si aprono solo se la $[Ca^{2+}]_i$ è sufficientemente alta. In funzione delle proprietà di conduttanza di singolo canale e di sensibilità farmacologica, è possibile distinguere i "big K_{Ca} " o BK, ad alta conduttanza (>200pS) e sensibili alla carbodotossina (una tossina isolata dal veleno di scorpioni), gli "intermediate K_{Ca} " o IK (10-20 pS), e gli "small K_{Ca} " o SK, a conduttanza assai minore (<10pS) e specificamente bloccati dall'apamina (una tossina isolata dal veleno di api) (Tabella 22.10). I BK sono anche attivati dalla depolarizzazione, e contribuiscono alla ripolarizzazione del potenziale di azione. Sia i BK che gli SK sono responsabili della fase di iperpolarizzazione transitoria che in molte cellule nervose segue il potenziale d'azione e ha lo scopo di modulare la frequenza dei potenziali durante il "firing" ripetitivo e di spaziare periodi di attività con intervalli di quiescenza (AHP). I canali BK sono anche coinvolti nella regolazione del tono vascolare; a tale livello, essi sono inoltre regolati direttamente dal monossido d'azoto, un

TABELLA 22.10 Classificazione e proprietà dei principali canali del K^+ attivati dal calcio

Sottofamiglie, altri nomi	$K_{Ca}1.1$ (KCNMA1, maxi-K, BK, slo)	$K_{Ca}2.1$ (KCNN1, SKCa1, SK1)	$K_{Ca}2.2$ (KCNN2, SKCa2, SK2)	$K_{Ca}2.3$ (KCNN3, SKCa3, SK3)	$K_{Ca}3.1$ (KCNN4, IKCa1, SK4, Gardos channel)
Subunità associate	KCNMB1-4	Calmodulina al C-terminale	Calmodulina al C-terminale	Calmodulina al C-terminale	Calmodulina al C-terminale
Tessuto	Ubiquitario: cervello, muscolo scheletrico, liscio	Cervello (ippocampo, talamo), ipofisi, glioblastomi, aorta	Ubiquitario. cervello (ippocampo, talamo), ipofisi, prostata, cuore ecc	Ubiquitario: cervello (ippocampo, talamo), linfociti, ipofisi, prostata, colon	Eritrociti, linfociti, pancreas, muscolo liscio
Bloccanti	TEA, charybdoTx, iberioTx, paxillina	Apamina	Apamina	Apamina	charybdoTx, mauroTx, TRAM-34
Attivatori	$[Ca^{2+}]_i$, benzimidazoli, terpenoidi, voltaggio-dipendente	$[Ca^{2+}]_i$, (K_d 0.7 μ M, 4 molecole), voltaggio-indipendente	$[Ca^{2+}]_i$, (K_d 0.6 μ M, 4 molecole), EBIO, chlorozoxazone, voltaggio-indipendente	$[Ca^{2+}]_i$, (K_d 0.6 μ M), EBIO, voltaggio-indipendente	$[Ca^{2+}]_i$, (K_d 0.2 μ M), EBIO, metilxantine, voltaggio-indipendente
Conduttanza di singolo canale	260 pS	2-3 pS	2-3 pS	2-3 pS	11 pS
Fisiologia	Iperpolarizzazione postuma	Iperpolarizzazione postuma	Iperpolarizzazione postuma	Iperpolarizzazione postuma	Regolazione di volume degli eritrociti
Farmacologia, bersaglio	"Openers" in epilessia, asma, ipertensione, ipermotilità gastrica	Modulatori utili nella distrofia miotonica, disordini della memoria	Modulatori utili nella distrofia miotonica, disordini della memoria	Modulatori utili nella distrofia miotonica, disordini della memoria	Bloccanti utili per anemia, diarrea
Canalopatie	-	-	-	Schizofrenia (per eccesso di poliglutamine); atassia	-

altro importante mediatore vasoattivo (vedi Capitolo 38). Viceversa, gli IK, che sono espressi in molti tessuti anche non-eccitabili, partecipano alla regolazione del volume e alla proliferazione cellulare. La Ca^{2+} -dipendenza dei K_{Ca} sembra dipendere dalla loro capacità di legare direttamente il Ca^{2+} citoplasmatico (come nel caso dei canali BK), o di associarsi con la proteina ubiquitaria Ca^{2+} -legante calmodulina, che fungerebbe da "sensore" per il Ca^{2+} (come nel caso dei canali SK e IK); tale interazione Ca^{2+} -CaM verrebbe trasmessa mediante una modifica conformazionale, al poro del canale, determinandone l'apertura.

I canali K_{Ca} sono anche bersaglio d'azione di alcuni KCO

Oltre ai prima descritti KCO attivi sui canali K_{ATP} ($\text{K}_{\text{ATP}}\text{CO}$), esistono molecole specificamente attive sui canali K_{Ca} , in particolare sui BK (Tabella 22.7). Tra questi, si ricordano alcuni composti benzimidazolici come l'NS-004 e l'NS-1619, che causano rilassamento della muscolatura tracheo-bronchiale e potrebbero essere sviluppati come antiasmatici di nuova generazione, e il composto naturale terpenoide DHS-1 (deidrosaponina 1) usato nel trattamento della dismenorrea e dell'asma. Nuovi attivatori di BK aventi struttura fluoro-ossindolica (BMS-204352) e marcata capacità d'accumulo a livello cerebrale si sono anche dimostrati attivi nel determinare neuroprotezione in modelli animali d'ischemia cerebrale acuta.

Canali non selettivi, anionici e altri

Appartengono a tale categoria sia canali attivati prevalentemente da ligandi extracellulari (sia cationici come il recettore nicotinico che anionici come il recettore GABA_A , per la cui trattazione si rimanda al Capitolo 15) o intracellulari (nucleotidi ciclici), che canali responsivi alle variazioni del potenziale di membrana. In tale ambito, verranno trattati qui solo quelli che hanno una maggiore rilevanza in ambito farmacologico. Per la trattazione dei canali non selettivi definiti TRP (*Transient Receptor Potential*), vedi **CD**: Approfondimento 22.7. *Canali ionici TRP*; dei canali del Na^+ non voltaggio-dipendenti (ENaC) e sensibili all'acido (ASIC), vedi **CD**: Approfondimento 22.8. *Canali del sodio non voltaggio dipendenti epiteliali (ENaC) e sensibili all'acido (ASIC)*; dei canali anionici, vedi **CD**: Approfondimento 22.9. *Canali per anioni*; dei canali per l'acqua, vedi **CD**: Approfondimento 22.10. *Canali per l'acqua: le acquaporine*; dei canali responsabili del riempimento dei depositi di Ca^{2+} del reticolo endoplasmatico, vedi **CD**: Approfondimento 22.11. *Canali del Ca^{2+} voltaggio-indipendenti attivati dalla deplezione dei depositi del reticolo endoplasmatico*; dei canali presenti nelle giunzioni comunicanti, vedi **CD**: Approfondimento 22.12. *Modulazione farmacologica delle giunzioni comunicanti e delle sinapsi elettriche*.

Canali cationici modulati dai nucleotidi ciclici

Tali canali sono variamente responsivi alle variazioni del potenziale di membrana, ma, pur discriminando i cationi

dagli anioni, non mostrano un elevato grado di selettività tra Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . In condizioni fisiologiche, essendo il potenziale di riposo della maggior parte delle cellule prossimo al potenziale di equilibrio per il K^+ , l'attivazione di questi canali determina depolarizzazione cellulare. Appartengono a tale classe i canali regolati da nucleotidi ciclici, sia della classe dei CNG (*Cyclic Nucleotide-Gated*) che HCN (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated*). I membri di entrambe tali classi sono formati da eterotetrameri in cui ciascuna subunità presenta la classica struttura a 6 elementi transmembranari (analoga a quelle dei canali voltaggio-dipendenti del K^+ o dei domini dei canali del Na^+ o del Ca^{2+}), ma possiedono al C-terminale un dominio citoplasmatico che presenta una elevata selettività per il cGMP o il cAMP (CNBD, *Cyclic Nucleotide Binding Domain*). Esistono subunità accessorie che conferiscono, nei differenti tessuti la diversa sensibilità agli attivatori (cGMP, cAMP) (Tabella 22.11). I canali della famiglia CNG sono scarsamente responsivi alle variazioni di potenziale di membrana, sono espressi nei fotorecettori e nell'epitelio olfattivo e hanno selettività per il $\text{Ca}^{2+} > \text{Na}^+ \sim \text{K}^+$. La loro funzione fisiologica è collegata ai cambiamenti transitori della concentrazione citosolica del cGMP mediata da G-proteine (trasduttori, via fosfodiesterasi) attivate dalla luce o da molecole odorose. I canali CNG, che si aprono quando aumentano le concentrazioni intracellulari di cGMP, permettono di trasdurre un segnale luminoso in un segnale elettrico. Sono normalmente poco voltaggio-dipendenti e, quando aperti, contribuiscono a depolarizzare le cellule verso 0 mV. Sono bloccati dal L-cis diltiazem e la loro delezione o mutazioni producono anosmia o acromatopsia.

I canali della famiglia HCN sono fortemente attivati dal voltaggio e modulati dal cAMP (Figura 22.9). Tali canali producono correnti depolarizzanti alla base del "pacemaker" cardiaco o neuronale (le correnti sottese da questi canali vengono descritte come I_f o I_h , rispettivamente, a livello cardiaco e neuronale) e di molte attività ritmiche nel sistema nervoso centrale. Questi canali hanno la caratteristica peculiare di aprirsi, diversamente da tutti gli altri, a potenziali negativi partendo dal potenziale di riposo, al quale sono quasi completamente chiusi.

Il canale della corrente I_f ha una selettività per cationi monovalenti ($\text{Na}^+ < \text{K}^+$) e la sua funzione cellulare è sostanzialmente depolarizzante in un intervallo di potenziali relativamente negativi, da -70/-60 mV fino a -55 mV con una cinetica di apertura molto lenta (500 ms). Quando la membrana si ripolarizza dopo un potenziale d'azione, questa corrente si attiva inducendo l'ingresso nella cellula di una corrente mista di Na^+ e K^+ che provoca una lenta depolarizzazione fino a raggiungere la soglia per innescare un altro potenziale d'azione e quindi determina l'attività ritmica spontanea delle cellule "pace-maker". Il canale può essere bloccato a opera del cesio, ma anche da molecole organiche quali ZD7288, zetabradina e ivabradina, ed è regolato dai livelli di cAMP che spostano verso valori positivi la curva di attivazione (Figura 22.9). Esso è dunque poten-

TABELLA 22.11 Classificazione e proprietà dei principali canali cationici modulati dai nucleotidi ciclici

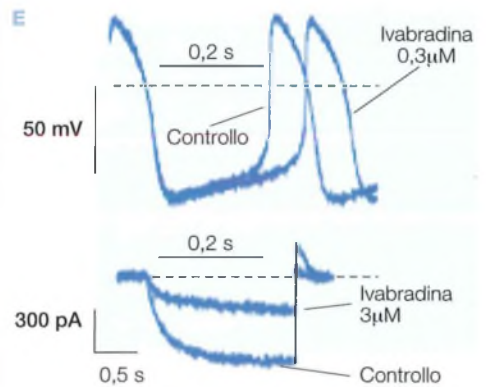
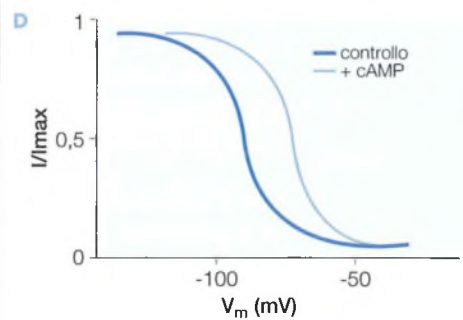
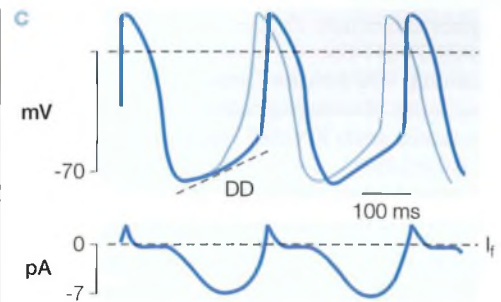
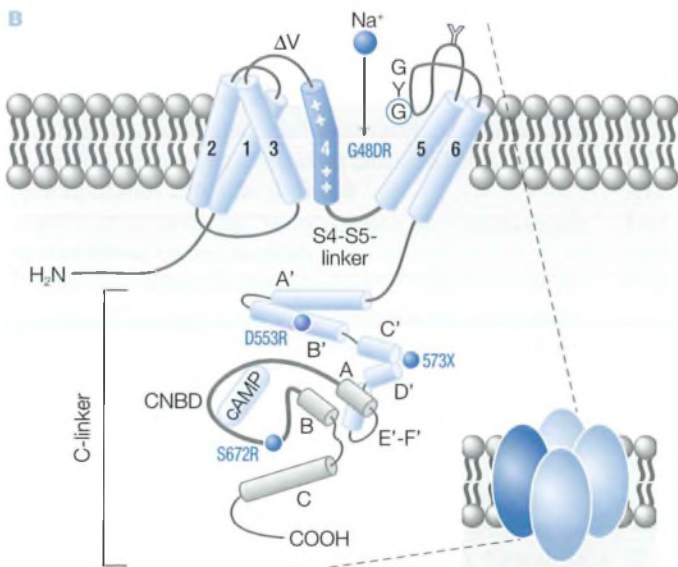
Sottofamiglie	CNGA1	CNGA2	CNGA3
Subunità necessarie associate	CNGB1 (la stechiometria del canale dei bastoncelli retinici è 3 CNGA1/ 1 CNGB1)	CNGB1, CNGA4 (la stechiometria del canale è 2 CNGA2/ 1 CNGB1/1 CGNA4)	CNGB3 (la stechiometria del canale dei coni retinici è 2 CNGA3/ 2 CNGB3)
Tessuto	Bastoncelli della retina	Neuroni olfattivi	Coni della retina, neuroni olfattivi
Bloccanti	L-cis diltiazem	Pseudochetossina (PsTx) estratta dal veleno del serpente australiano <i>Pseudechis australis</i> (IC ₅₀ nanomolare)	L-cis diltiazem
Attivatori	cGMP >> cAMP N.B. Il cAMP è un attivatore parziale, del canale dei bastoncelli, determinando risposte pari al 10-40% della risposta massima da cGMP	cGMP ~ cAMP	cGMP > cAMP
Conduttanza, selettività	27 pS, Ca ²⁺ > K ⁺ ~ Na ⁺	35 pS, Ca ²⁺ > K ⁺ ~ Na ⁺	40 pS, Ca ²⁺ > K ⁺ ~ Na ⁺
Fisiologia	Trasduzione luminosa	Trasduzione olfattiva	Visione colorata diurna
Canalopatie	Mutazioni in CNGA1 o CNGB1 sono responsabili di una rara forma di retinite pigmentosa a trasmissione AR	La delezione di ciascuno dei tre geni altera la sensibilità agli odori	Mutazioni in CNGA3 o CNGB3 producono acromatopsia completa

ziato dall'attivazione del sistema nervoso simpatico, da agonisti β-adrenergici, VIP, glucagone, e dai bloccanti delle fosfodiesterasi quali le metilxantine, mentre è inibito dall'attivazione del sistema parasimpatico e dagli agonisti muscarinici.

L'inibizione di I_f produce effetti bradicardizzanti, con conseguente riduzione della domanda di ossigeno nel miocardio e miglioramento dell'apporto di sangue all'endocardio; pertanto tale azione farmacologica potrebbe esercitare vantaggiosi effetti antischemici e antianginosi. Infatti, l'ivabradina è un farmaco attualmente disponibile per uso clinico nella maggior parte dei Paesi europei che agisce come inibitore di I_f; molti studi preclinici e clinici hanno dimostrato l'efficacia antischemica dell'inibizione della corrente I_f e dell'ivabradina come antianginoso; attualmente, è in corso un ampio studio clinico (studio SHIFT) al fine di valutare l'effetto della riduzione della frequenza cardiaca conseguente al blocco farmacologico di I_f con l'ivabradina sull'incidenza di eventi cardiovascolari e sulla mortalità in pazienti affetti da scompenso cardiaco. Uno degli effetti collaterali più comuni dell'ivabradina è la comparsa di sensazioni luminose definite fosfeni, forse conseguenti al blocco dei canali HCN localizzati a livello retinico.

FIGURA 22.9 Ruolo fisiologico, struttura e determinanti molecolari della corrente I_f cardiaca. **A.** Localizzazione del nodo seno-atriale (SAN). **B.** Struttura dei canali HCN. I canali HCN sono tetrameri. Ciascun monomero è costituito da sei segmenti transmembrana, con una regione di sensore del voltaggio (S1-S4) e una parte del poro tra l'S5 e l'S6. La regione del poro contiene il filtro di selettività (motivo GYG). Il dominio C-terminale è composto dal C-linker (che consiste di sei α-eliche, designate da A' a F'), e dal sito di legame per i nucleotidi ciclici (*Cyclic Nucleotide-Binding Domain*, CNBD). Il CNBD segue il dominio C-linker ed è formato dalle α-eliche A-C con una regione a foglietto β tra le eliche A e B (linea grigia spessa). I cerchi blu indicano le posizioni delle mutazioni responsabili di canalopatie in HCN4 (bradicardia sinusale familiare, vedi Tabella 22.1). Il sito di N-glicosilazione tra l'S5 e il poro è indicato con una Y. **C.** Pannello superiore: potenziali idealizzati del nodo del seno in condizioni di riposo (linea spessa) e durante stimolazione adrenergica (linea sottile). DD, depolarizzazione diastolica. Pannello inferiore: time-course idealizzato della corrente I_f durante tali potenziali delle cellule pacemaker. **D.** Curva di attivazione in funzione del potenziale della corrente I_f in assenza (linea spessa) e in presenza (linea sottile) di cAMP (come si verifica in seguito a stimolazione del recettore β₁-adrenergico); si noti che, in presenza di cAMP, la curva è spostata verso destra, per cui la corrente contribuisce maggiormente alla depolarizzazione diastolica. (Da: Biel M et al. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 2009;89:847-85, modificata). **E.** Effetto bradicardizzante dei bloccanti di I_f. Pannello superiore: l'ivabradina (0,3 μM) riduce la frequenza spontanea dei miociti isolati del SAN riducendo la pendenza della depolarizzazione diastolica, un'azione attribuibile all'inibizione di I_f, come mostrato in esperimenti di voltage-clamp nel pannello inferiore (ivabradina 3 μM). (Da: Bucchi A et al. Heart rate reduction via selective "funny" channel blockers. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:208-13, modificata).

HCN1	HCN2	HCN3	HCN4
Neuroni centrali (corteccia, ippocampo, cervelletto, tronco, midollo spinale), retina, neuroni periferici (cellule gangliari delle radici dorsali, nodo seno-atriale)	Neuroni centrali (ubiquitario, soprattutto talamo e nuclei troco encefalici), retina, cuore (nodo seno-atriale, dove rappresenta il 20% di I_f nell'uomo, tessuto atriale e ventricolare)	Neuroni centrali (poco espresso, soprattutto bulbo olfattorio e alcuni nuclei ipotalamici), retina, periferici, nodo seno-atriale	Neuroni centrali (molto espresso nel talamo e nelle cellule mitrali del bulbo olfattorio), retina, cuore (nodo seno-atriale dove rappresenta l'80% di I_f , nodo atrioventricolare fibre di Purkinje)
Cs ⁺ , ZD7288, Zetabradina, ivabradina	Cs ⁺ , ZD7288, Zetabradina, ivabradina	Cs ⁺ , ZD7288, Zetabradina, ivabradina	Cs ⁺ , ZD7288, Zetabradina, ivabradina
cGMP < cAMP	cGMP (K _a 6 mM) < cAMP (K _a 50-500 nM)	cGMP < cAMP	cGMP < cAMP
γ , K ⁺ > Na ⁺	γ , K ⁺ > Na ⁺ (P _{Na:P_K} = 1:3 - 1:5)	γ , K ⁺ > Na ⁺	γ , K ⁺ > Na ⁺
Attività contapasso	Attività contapasso	Attività contapasso	Attività contapasso
-	Topo knockout. Soffre di atassia, epilessia e aritmie	-	Bradycardia del seno



TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I canali ionici rappresentano importanti bersagli molecolari diretti per numerose classi di farmaci che trovano impiego in cardiologia, neurologia, endocrinologia, anesthesiologia e altre aree della medicina.
- ▶ Interazioni con specifiche classi di canali ionici possono essere predittive di profili di attività terapeutica o di tossicità da parte delle diverse molecole.
- ▶ Farmaci che interagiscono con recettori metabotropici di membrana e che modificano importanti vie biochimiche di modulazione di membrana o intracellulari possono indirettamente influenzare l'attività di canali ionici, espandendone ulteriormente le possibilità di modulazione farmacologica.

Bibliografia essenziale

- ▶ Ashcroft E Ion Channels and Disease. London (UK): Academic Press, 2000.
- ▶ Biel M, Wahl-Schott C, Michalak S, Zong X. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 2009;89:847-85.
- ▶ Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;6:521-55.
- ▶ Harmar AJ, Hills RA, Rosser EM et al. IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucl Acids Res* 2009;37(Database issue): D680-D685 (disponibile su <http://www.iuphar-db.org/>).
- ▶ Hille B. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd Edition. Sunderland, MA (USA): Sinauer Associates Inc. Publishers, 2001.
- ▶ Mantegazza M, Curia G, Biagini G et al. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets in epilepsy and other neurological disorders. *Lancet Neurol* 2010;9:413-24.
- ▶ Miceli F, Soldovieri MV, Martire M, Tagliatela M. Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:65-74.
- ▶ Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. How Does Voltage Open an Ion Channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:23-52.
- ▶ Wulff H, Castle NA, Pardo LA. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:982-1001.

I trasportatori di membrana

Lucio Annunziato, Giuseppe Pignataro, Gianfranco Di Renzo

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le basi teoriche e pratiche per comprendere i meccanismi di trasporto attraverso le membrane cellulari
- ▶ Acquisire nozioni di base sui sistemi di trasporto ATP-dipendenti e ATP-indipendenti
- ▶ Acquisire i concetti base relativi ai farmaci in grado di modulare l'attività dei trasportatori di membrana, con particolare riferimento a farmaci diuretici, inibitori di pompa protonica e glicosidi digitalici

Le cellule per comunicare con l'ambiente extracellulare, per soddisfare le esigenze metaboliche e per mantenere l'omeostasi ionica cellulare sono dotate di sistemi di trasporto denominati trasportatori di membrana. Essi consentono alle diverse molecole di attraversare la membrana plasmatica. Un trasportatore è una proteina integrale di membrana in grado di mediare il trasporto all'interno della cellula di ioni o molecole polari di medie dimensioni quali amminoacidi, zuccheri o nucleotidi. Sebbene i trasportatori di membrana fino a ora identificati e caratterizzati siano numerosissimi, essi possiedono alcune caratteristiche in comune quali la selettività per il substrato e il cambiamento conformazionale che accompagna la translocazione del substrato attraverso la membrana. In generale, è possibile affermare che i trasportatori di membrana differiscono solamente per il meccanismo di azione, la localizzazione nella cellula e il tipo di molecola trasportata.

Le diverse molecole che passano attraverso la membrana plasmatica possono essere trasportate singolarmente o in contemporanea con altre molecole.

I trasportatori possono traslocare ioni oppure molecole più complesse come i farmaci.

Vi sono diversi tipi di trasporto.

L'*uniporto* è il trasporto di una sola sostanza che si muove sfruttando la differenza di potenziale elettrochimico creato da altri trasportatori.

Il *cotrasporto* è il trasporto contemporaneo di due specie ioniche o di altri soluti. Questo tipo di trasporto viene a sua volta distinto in antiporto e simporto.

L'*antiporto*, o scambio di soluti, è il trasporto contemporaneo di due specie ioniche o di altri soluti che si muovono in direzioni opposte attraverso la membrana. Una delle

due sostanze viene lasciata fluire secondo gradiente, da un compartimento ad alta concentrazione a uno a bassa concentrazione. Questo genera l'energia entropica necessaria per determinare il trasporto dell'altro soluto contro gradiente, ovvero da un compartimento a bassa concentrazione a uno ad alta concentrazione.

Il *simporto* usa, analogamente all'antiporto, il flusso di un soluto secondo gradiente per muovere un'altra molecola contro gradiente, ma il movimento avviene in questo caso attraversando la membrana nella stessa direzione. A seconda del consumo o meno di energia è possibile distinguere due tipi di trasporto di membrana: trasporto attivo, ATP-dipendente e trasporto passivo, ATP-indipendente.

Trasportatori ATP-dipendenti

Il *trasporto attivo* permette il passaggio di soluti contro il gradiente di concentrazione. Tale passaggio è mediato da proteine di membrana che richiedono l'utilizzo di energia fornito da ATP e vengono pertanto definiti trasportatori ATP-dipendenti.

Essi si dividono, a loro volta, in: trasportatori ABC, trasportatori P e trasportatori F e V.

▶ I trasportatori ABC (*ATP-binding cassette*) utilizzano l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per trasportare varie sostanze attraverso le membrane cellulari. Nei batteri, trasportano vari substrati essenziali come glucidi, vitamine e ioni all'interno della cellula. Nelle cellule eucariotiche, essi trasportano principalmente molecole all'esterno della membrana plasmatica o all'interno di organuli endoplasmatici come il reticolo endoplasmatico e i mitocondri. Più recentemente è stata dimostrata la loro presenza all'interno della placenta, con il ruolo

di rimuovere xenobiotici dalla circolazione fetale e di rifornire quest'ultima di sostanze utili. I composti trasportati includono lipidi, ioni, piccole molecole, grandi polipeptidi e farmaci (Tabella 23.1). Mutazioni nei geni che codificano per questi trasportatori causano o contribuiscono a generare una grande varietà di patologie quali la fibrosi cistica, difetti nel trasporto di colesterolo e bile, disordini neurologici, anemia, risposta anomala ai farmaci. Tra i più noti trasportatori appartenenti a questa classe ricordiamo CFTR, codificato dal gene ABCC7, coinvolto nella patogenesi della fibrosi cistica e le MRP (*Multi drug Resistance Protein*) coinvolte nell'estrusione dei farmaci (vedi **CD**: Approfondimento 23.1. *I sistemi di estrusione dei farmaci*).

- I trasportatori P sono deputati principalmente al trasporto di ioni. Sono costituiti da un'unica catena polipeptidica che esplica sia la funzione idrolitica dell'ATP che quella trasportatrice. Vengono detti di tipo P per la presenza di un sito di fosforilazione a livello di un aspartato; esempi di tale classe sono la Na^+/K^+ , H^+/K^+ , e Ca^{2+} ATPasi. Tali trasportatori possono essere presenti sia sulla membrana plasmatica che sulla membrana del reticolo endoplasmatico (Tabella 23.2).
- I trasportatori F e V sono ATPasi deputate esclusivamente al trasporto di protoni. Questa classe di trasportatori è strutturalmente più complessa, essendo formata da più subunità proteiche che si assemblano sulla membrana di molti compartimenti intracellulari. La loro complessità si evince anche dal maggiore peso molecolare, che può superare i

500 kDa. A differenza delle ATPasi di tipo P, quelle di tipo F e di tipo V non trasferiscono su un proprio amminoacido alcun residuo di fosfato. Le ATPasi di tipo F si trovano nei mitocondri, dove sono responsabili della movimentazione di protoni per la sintesi energetica della cellula. Le ATPasi di tipo V, inizialmente identificate sui vacuoli, sono presenti anche sui lisosomi, dove con il trasporto di protoni favoriscono l'instaurazione di un ambiente idrolizzante acido. Le ATPasi appartenenti a questa classe rivestono scarso interesse farmacologico, essendo state identificate finora solo poche molecole in grado di interferire con l'attività di tali trasportatori.

Trasportatori ATP-indipendenti

A differenza del trasporto attivo, il *trasporto passivo* avviene secondo gradiente di concentrazione e non necessita dunque dell'utilizzo di energia biochimica sotto forma di ATP. Esso può essere mediato da proteine di membrana, denominati trasportatori SLC (*Solute Carrier*).

La superfamiglia dei trasportatori SLC comprende geni che codificano per proteine in grado di mediare il cosiddetto trasporto facilitato e per trasportatori in grado di mediare un trasporto attivo secondario accoppiato allo scambio di ioni.

Fino a ora sono state identificate 43 famiglie SLC che codificano per oltre 300 trasportatori. Per la rilevanza farmacologica, tra tali trasportatori vanno ricordati i trasportatori della dopamina (DAT), della noradrenalina (NET), della serotonina (SERT), del GABA (GAT), del glutammato (EAAT), codificati dai geni della famiglia SLC6, rispettivamente. Importanti sono pure i trasportatori vescicolari delle monoamine (VMAT) (vedi Capitolo 24). Inoltre, vanno menzionati lo scambiatore Na^+/H^+ , lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, il trasportatore $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (Tabella 23.2).

L'interesse farmacologico per i trasportatori di membrana risiede nel fatto che composti in grado di modulare l'attività di tali proteine possono contribuire a determinare variazioni farmacocinetiche e farmacodinamiche. Infatti, molti dei trasportatori che hanno rilevanza farmacologica controllano la distribuzione tissutale dei farmaci, così come l'assorbimento e l'eliminazione degli stessi. Altri trasportatori rappresentano i bersagli farmacologici di differenti classi di composti. Difatti, numerosi antidepressivi esercitano la loro azione agendo sul NET (SLC6A2) e sul SERT (SLC6A4). Alcuni antiepilettici agiscono inibendo il GAT. Farmaci d'abuso come la cocaina agiscono inibendo il DAT e il NET. I glicosidi digitalici esercitano l'azione inotropica positiva inibendo la Na^+/K^+ ATPasi. Molti diuretici agiscono interferendo con trasportatori espressi a livello del nefrone, quali i trasportatori Na^+/H^+ e $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (vedi **CD**: Approfondimento 23.2. *I glicosidi cardioattivi* e Approfondimento 23.3. *Farmaci diuretici*).

Va inoltre sottolineato che molti trasportatori sono coinvolti in importanti fenomeni di resistenza ai farmaci nonché nel trasporto di farmaci attraverso le cellule che costituiscono la barriera ematoencefalica (BEE).

TABELLA 23.1 Trasportatori ATP-dipendenti

Tipo ABC	Glicoproteina P (P-gp) o MDR1 (ABCB1)
	CFTR (ABCC7)
	ABC, trasporto del retinale
	ABCG2, trasporto dei farmaci
	MIRP1, trasporto dei farmaci
Tipo P	Na^+/K^+ ATPasi
	Ca^{2+} ATPasi
	H^+/K^+ ATPasi
	Mg^{2+} ATPasi
	H^+ ATPasi

TABELLA 23.2 Esempi di trasportatori ATP-dipendenti appartenenti alla famiglia dei soluti carrier (SLC)

Trasportatori ionici	SLC4, Trasportatore di HCO_3^-
	SLC8, Scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
	SLC9, Scambiatore Na^+/H^+
	SLC24, Scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$
	SLC12, Cotrasportatore $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$
Trasportatori neurotrasmettitori-ioni	SLC2, Trasportatore glutammato
	SLC6, Cotrasportatore monoamine (DAT, NET, SERT), Na^+ e Cl^-

Verranno di seguito presi in rassegna i più comuni trasportatori la cui modulazione riveste importanza farmacologica.

Na⁺/K⁺ATPasi

La pompa Na⁺/K⁺ATPasi è un importante complesso proteico presente in maniera ubiquitaria in quasi tutte le cellule del corpo umano ed è importante per il mantenimento del gradiente transmembrana degli ioni K⁺ e Na⁺

L'importanza di tale sistema di trasporto si evince dal fatto che esso utilizza tra il 40% e il 70% di tutta l'energia impiegata dalla cellula per mantenere l'attività di trasporto ionico. Tale energia viene utilizzata per lo scambio attivo tra sodio intracellulare e potassio extracellulare con una stechiometria di 2 ioni K⁺ contro 3 ioni Na⁺. L'attività della Na⁺/K⁺ATPasi è di fondamentale importanza per il mantenimento del gradiente ionico transmembrana del K⁺ e dell'Na⁺. L'equilibrio di quest'ultimo gradiente è fondamentale per il trasporto secondario di altri importanti ioni, quali ad esempio il Ca²⁺ attraverso lo scambiatore Na⁺/Ca²⁺, o i protoni attraverso lo scambiatore Na⁺/H⁺.

D'altra parte la pompa Na⁺/K⁺ATPasi è essenziale per la conservazione dell'osmolarità della cellula e del suo potenziale di riposo. Sebbene tali funzioni siano critiche specialmente per le cellule neuronali, cardiache e renali, tutte le cellule del corpo umano dipendono in ultima analisi dal corretto funzionamento della Na⁺/K⁺ATPasi.

Struttura

La Na⁺/K⁺ATPasi è stata il primo trasportatore di membrana a essere stato scoperto e rappresenta tuttora uno dei trasportatori di membrana più studiati. La caratterizzazione di tale sistema di trasporto, avvenuta nel 1957, ha consentito al danese Jens Christian Skou di ottenere il premio Nobel per la Chimica nel 1997.

La Na⁺/K⁺ATPasi appartiene alla famiglia delle ATPasi di tipo P, analogamente alla pompa H⁺/K⁺ e alla Ca²⁺ATPasi. I membri di questa famiglia si autofosforilano in seguito all'idrolisi di ATP da essi stessi mediata; tale fosforilazione catalizza modificazioni conformazionali essenziali per il funzionamento della pompa.

In particolare, la Na⁺/K⁺ATPasi consiste di un core eterodimerico, costituito dalle subunità α e β , che può essere associato a una terza subunità denominata γ (Figura 23.1). Tali subunità presentano proprietà distinte e peculiari.

La subunità α è una proteina di 112 kDa costituita da 10 segmenti transmembranari, con le porzioni N e C terminali localizzate all'interno della cellula. Dal momento che tale subunità contiene importanti siti per il legame dell'ATP e per la fosforilazione, oltre che per il trasporto ionico, tale subunità rappresenta il core catalitico della pompa. La subunità α rappresenta anche il sito primario di legame per molti agenti farmacologici in grado di in-

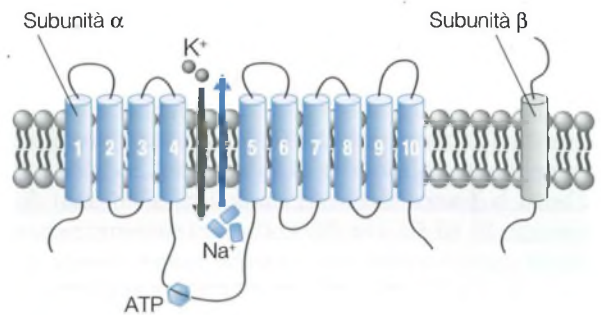


FIGURA 23.1 Struttura della Na⁺/K⁺ATPasi. La Na⁺/K⁺ATPasi è un eterodimero, costituito dalle subunità α (in blu) e β (in grigio), che può essere associato a una terza subunità denominata γ (non rappresentata in figura). La subunità α contiene importanti siti per il legame dell'ATP (esagono blu) e per la fosforilazione, oltre che per il trasporto ionico e rappresenta la parte catalitica della pompa. La subunità α rappresenta anche il sito primario di legame per molti agenti farmacologici. La subunità β è glicosilata e gioca un ruolo chiave nella maturazione, nel trasporto e nella stabilizzazione della Na⁺/K⁺ATPasi; inoltre essa presenta residui chiave per il legame del K⁺ e della ouabaina.

terferire con la funzionalità della Na⁺/K⁺ATPasi. Sebbene il loro ruolo funzionale non sia stato ancora descritto, è noto che esistono quattro isoforme della subunità α . Tali isoforme denominate α_1 , α_2 , α_3 e α_4 , differiscono nella loro cinetica, nell'affinità per i diversi ligandi oltre che nella distribuzione tessutale e cellulare.

La subunità β è una proteina di 35 kDa costituita da un singolo segmento transmembranario. Tale subunità glicosilata gioca un ruolo chiave nella maturazione, nel trasporto e nella stabilizzazione della Na⁺/K⁺ATPasi; inoltre essa presenta residui chiave per il legame del K⁺ e della ouabaina. Così come per la subunità α , anche per la subunità β sono state descritte numerose isoforme che influenzano la stabilità e l'affinità della Na⁺/K⁺ATPasi per i propri ligandi.

La subunità γ , infine, è una proteina di membrana di 6,5 kDa associata con la Na⁺/K⁺ATPasi in modo tessuto-specifico. Nonostante la subunità γ non sia essenziale per l'espressione e l'attività della pompa, essa è presente in un rapporto di 1:1 con la subunità α e con la subunità β e, in alcuni tessuti, interagisce con il C-terminale della subunità α . Tale subunità γ influenza funzione e distribuzione della Na⁺/K⁺ATPasi aumentandone anche la propria affinità per l'ATP.

Per quel che concerne il sito di legame per gli ioni Na⁺ e K⁺, studi cristallografici hanno permesso di stabilire che tali ioni si legano a livello della stessa porzione della pompa Na⁺/K⁺ATPasi. Tale sito di legame è localizzato tra il IV, il V e il VI segmento transmembranario della subunità α . Il segmento citoplasmatico localizzato tra il IV e il V segmento transmembranario della subunità α è inoltre implicato nell'idrolisi dell'ATP, mentre le regioni limitrofe al VII e al IX segmento transmembranario sono critiche per le interazioni con le subunità β e γ , rispettivamente.

Proprietà biofisiche

La pompa si alterna tra due possibili stadi denominati E1 ed E2

Il modo di operare della $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$ è comunemente esemplificato dal modello di Albers-Post. Secondo tale schema la pompa si alterna tra due possibili stadi denominati E1 ed E2, che differiscono in conformazione e affinità per gli ioni Na^+ e K^+ . La transizione tra questi due stadi, che dipende dal voltaggio e dalle concentrazioni di Na^+ , K^+ e ATP, è accompagnata dal trasporto consecutivo di ioni sodio all'esterno e di ioni potassio all'interno della cellula (Figura 23.2). Nelle condizioni di riposo la pompa si trova nello stadio E1. Tale conformazione presenta una tasca cationica aperta verso lo spazio intracellulare che permette il legame di tre atomi di Na^+ e di 1 molecola di ATP sul versante intracellulare. L'idrolisi di ATP permette la fosforilazione della pompa e determina la chiusura della tasca cationica contenente i 3 ioni Na^+ . Un cambio conformazionale spontaneo determina successivamente il passaggio alla conformazione E2, che determina l'apertura della tasca cationica verso lo spazio extracellulare. Dal momento che questa conformazione presenta una bassa affinità per gli ioni sodio, tali ioni vengono rilasciati nello spazio extracellulare, completando in tal modo il trasporto degli ioni sodio dal versante intracellulare a quello extracellulare. Il complementare trasporto di K^+

all'interno della cellula inizia con il legame di 2 ioni K^+ nella tasca cationica aperta sul versante extracellulare della pompa nella conformazione E2. Il legame degli ioni K^+ determina la defosforilazione spontanea della pompa nella conformazione E2. Tale defosforilazione determina la chiusura della tasca cationica contenente i due ioni K^+ . In seguito al rilassamento della pompa nella conformazione E1, si osserva l'apertura della tasca cationica sul versante intracellulare, con il rilascio degli ioni K^+ all'interno della cellula. Il successivo legame di ATP all'interno della cellula stimola il rilascio di K^+ e inizia un nuovo ciclo catalitico. Lo schema di Albers-Post implica che un singolo eterodimero α/β sia sufficiente per l'attività della $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$. Dal momento che la $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$ trasporta ioni Na^+ e K^+ in un rapporto di 3:2, esso è un trasportatore elettrogenico, determinando dunque il trasporto netto di una carica positiva dall'interno all'esterno della cellula. Tale sistema di trasporto attivo comporta sia il consumo di O_2 che l'idrolisi di ATP.

Trasduzione del segnale

La $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$ attiva anche numerose vie trasduzionali intracellulari

Recentemente è stato stabilito che la $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$, oltre a rappresentare un importante meccanismo di trasporto

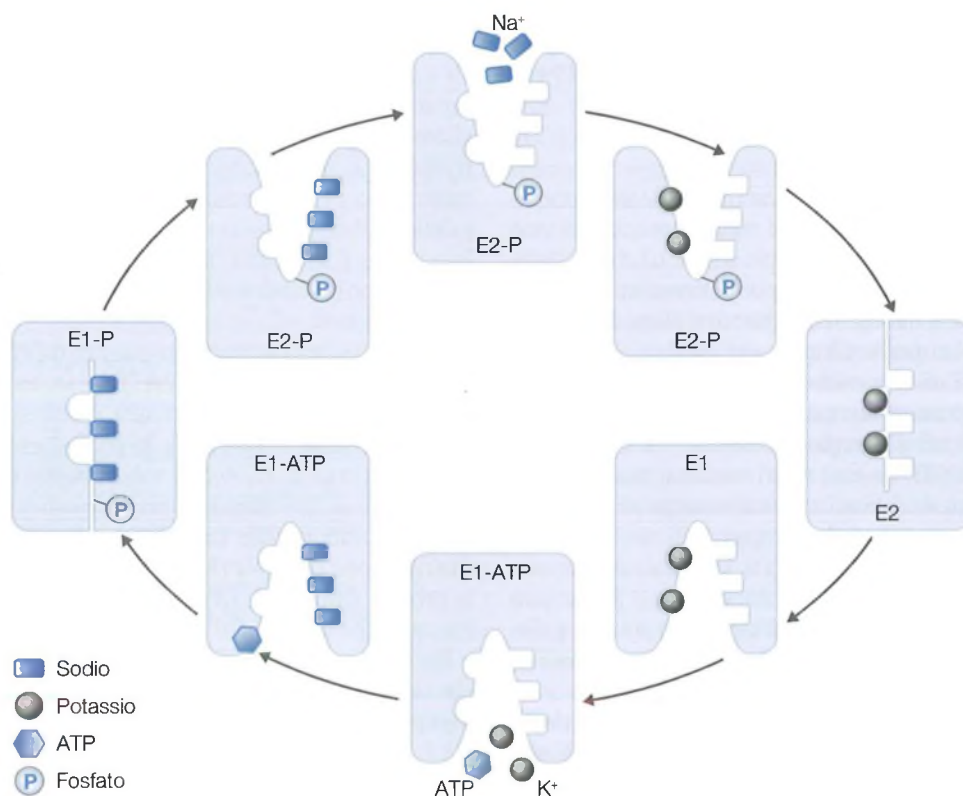


FIGURA 23.2 Modello di funzionamento della $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$. Il modo di operare della $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasi}$ è comunemente esemplificato dal modello di Albers-Post. Secondo tale schema la pompa si alterna tra due possibili stadi denominati E1 ed E2, che differiscono per conformazione e per affinità per gli ioni Na^+ e K^+ . La transizione tra questi due stadi, che dipende dal voltaggio e dalle concentrazioni di Na^+ , K^+ e ATP, è accompagnata dal trasporto consecutivo di ioni sodio all'esterno e di ioni potassio all'interno della cellula.

ionico, è in grado di attivare numerose vie trasduzionali intracellulari. In particolare, l'attivazione della Na^+/K^+ ATPasi è correlabile a segnali intracellulari mediati da chinasi appartenenti alle famiglie src, Ras, MEK, ERK, o da fattori di trascrizione come NF- κ B.

Farmaci attivi sulla Na^+/K^+ ATPasi

Un grande numero di farmaci in grado di interagire specificamente con la Na^+/K^+ ATPasi e di inibirne l'attività catalitica è stato isolato da piante e animali. Il gruppo più numeroso è rappresentato dagli steroidi cardiotonici, denominati anche glicosidi cardiaci o steroidi cardiaci, impiegati per il trattamento dello scompenso cardiaco, classi NYHA II E IV, di alcuni fenomeni tachicardici e della cardiomiopatia dilatativa (vedi **CD**: Approfondimento 23.2).

Tali composti sono stati ritrovati nelle foglie, nei fiori, nei semi, nelle radici e nella corteccia di una grande varietà di piante, ed essi per idrolisi acida o enzimatica danno luogo agli agliconi steroidei o genine, che sono veleni convulsivanti. Tra i principali steroidi glicosidici vi sono alcuni derivati della *Digitalis purpurea*, digossina e digitossina, che sono sostanze ad attività cardiotonica, e altri derivati della *Scilla maritima*, usati fino dal XIII secolo come veleno per topi.

I glicosidi cardioattivi agiscono legandosi alle porzioni extracellulari della subunità α , tale legame induce un cambiamento conformazionale che determina l'inibizione della pompa in maniera dose-dipendente. Ciò determina un aumento nella concentrazione intracellulare di Na^+ che induce lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a invertire la modalità fisiologica del suo funzionamento, estraendo ioni Na^+ e facendo entrare ioni Ca^{2+} . L'ingresso di ioni Ca^{2+} attraverso questa via attiva i recettori del Ca^{2+} attivati dal Ca^{2+} (CICR) o recettori della rianodina, presenti sulla membrana del reticolo endoplasmatico, determinando un aumento delle concentrazioni intracellulari di ioni Ca^{2+} (vedi Capitolo 9). Tale aumento intracellulare di Ca^{2+} sarebbe alla base dell'effetto inotropo positivo tipico di composti appartenenti alla classe dei glicosidi cardioattivi. Inoltre, la digossina è anche in grado di ridurre il tono simpatico e di incrementare il tono vagale, determinando una risposta ventricolare rallentata in corso di fibrillazione atriale.

Attualmente la digossina viene considerata un farmaco di seconda scelta, dopo gli ACE-inibitori e i β -bloccanti, per il trattamento dello scompenso cardiaco.

H^+/K^+ ATPasi

La pompa protonica H^+/K^+ ATPasi appartiene alla famiglia dei trasportatori ATPasici di tipo P

Questa ATPasi è stata inizialmente identificata circa 50 anni fa nel lievito, quando si vide che cellule di lievito fermentanti erano in grado di secernere grossi quantitativi di sostanze acide nel liquido extracellulare, e che il pH si abbassava ulteriormente in seguito all'aggiunta

di glucosio nel mezzo di coltura. Ciò dimostrava non solo che il lievito era in grado di secernere ioni H^+ , ma anche che l'estruzione di ioni H^+ era energia-dipendente. Nell'ambito di tale sistema di trasporto elettroneutro, il trasporto di ioni H^+ avviene dal citoplasma all'ambiente extracellulare, viceversa gli ioni K^+ vengono trasportati dallo spazio extracellulare nello spazio citoplasmatico. La pompa protonica H^+/K^+ ATPasi, sebbene identificata in numerosi tessuti, viene comunemente definita pompa protonica gastrica, rappresentando il meccanismo che più di ogni altro contribuisce all'acidificazione del contenuto gastrico.

Struttura

La pompa protonica H^+/K^+ ATPasi è costituita da due subunità

Essa presenta una struttura eterodimerica ed è costituita da una subunità α e da una subunità β (Figura 23.3). La subunità α , codificata dal gene ATP4A, è costituita da circa 1000 amminoacidi. Tale subunità è organizzata in 10 segmenti transmembrana, contiene i siti catalitici dell'enzima e forma il poro attraverso la membrana cellulare, struttura che permette il trasporto ionico. La subunità β , codificata dal gene ATP4B, è costituita da circa 300 amminoacidi. Tale subunità contiene un dominio citoplasmatico di 36 amminoacidi, un singolo dominio transmembrana e un dominio extracellulare altamente glicosilato. La subunità β stabilizza la subunità α della H^+/K^+ ATPasi ed è richiesta per il corretto funzionamento del trasportatore. A livello delle subunità α e β sono presenti molti segnali relativi all'espressione della pompa protonica in membrana.

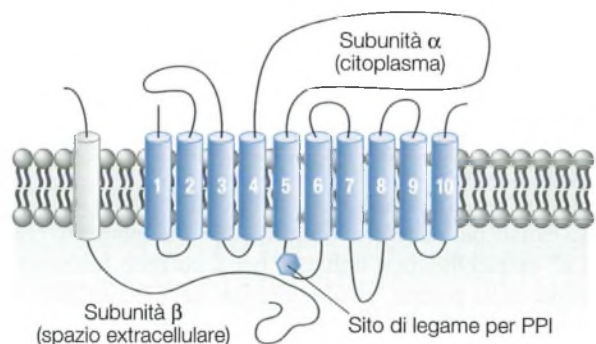


FIGURA 23.3 Struttura della pompa protonica. La pompa protonica H^+/K^+ ATPasi è un eterodimero costituito da una subunità α e da una subunità β . La subunità α contiene i siti catalitici dell'enzima e forma il poro attraverso la membrana cellulare, struttura che permette il trasporto ionico. Il sito di legame per gli inibitori di pompa protonica (PPI) è localizzato tra i segmenti transmembrana 5 e 6 (esagono blu).

La subunità β è costituita da circa 300 amminoacidi. Tale subunità contiene un dominio citoplasmatico di 36 amminoacidi, un singolo dominio transmembrana e un dominio extracellulare altamente glicosilato. La subunità β stabilizza la subunità α della H^+/K^+ ATPasi ed è richiesta per il corretto funzionamento del trasportatore.

Distribuzione

La pompa protonica H^+/K^+ ATPasi viene solitamente definita pompa gastrica protonica

Sebbene identificata in numerosi tessuti animali e vegetali, tale trasportatore rappresenta il meccanismo che più di ogni altro contribuisce all'acidificazione del contenuto gastrico. In particolare, la pompa protonica si localizza a livello delle cellule parietali della mucosa gastrica.

Elettrofisiologia e proprietà biofisiche

La pompa H^+/K^+ ATPasi è un trasportatore elettroneutro che, utilizzando l'energia derivante dall'idrolisi di ATP, è in grado di trasportare uno ione idrogeno dal citoplasma allo spazio extracellulare contro uno ione K^+ dallo spazio extracellulare al citoplasma. Essendo tale trasportatore membro delle ATPasi di tipo P, un gruppo fosfato viene trasferito dalla molecola di ATP al trasportatore durante il ciclo di trasporto ionico. Tale fosforilazione determina un cambio conformazionale che genera l'energia necessaria al trasferimento dei due ioni.

Il meccanismo è del tutto analogo a quello descritto per la Na^+/K^+ ATPasi e prevede pertanto la formazione degli intermedi reattivi E1 ed E2 aventi differente affinità di legame per gli ioni H^+ e K^+ .

Per il corretto funzionamento della pompa è necessaria la presenza di ioni K^+ all'esterno della cellula. Pertanto la pompa protonica è in grado di estrarre protoni con estrema facilità quando è associata, a livello della membrana canalicolare, con trasportatori in grado di consentire l'efflusso di ioni potassio dalle cellule parietali. A pH 8 la pompa è in grado di utilizzare ioni Na^+ in sostituzione degli ioni K^+ , in tal modo lo ione Na^+ può facilitare il trasporto di molecole di H_2O consentendo l'efflusso di ioni H_3O^+ e non di ioni H^+ .

La cellula parietale è in grado di funzionare correttamente solo in seguito alla propria attivazione. In seguito a tale attivazione si verifica una modificazione morfologica della cellula, che comporta anche il trasporto della pompa H^+/K^+ ATPasi da una localizzazione tubulovesicolare citoplasmatica a una localizzazione di membrana a livello del canalicolo secretorio (Figura 23.4). Dal momento che il K^+ extracellulare è richiesto per il corretto funzionamento della pompa, un'ulteriore fase nel meccanismo di attivazione della pompa protonica è rappresentato dalla presenza di trasportatori in grado di trasferire ioni K^+ dal citoplasma allo spazio extracellulare.

Regolazione

La secrezione gastrica acida è un processo dinamico e complesso che risulta essere regolato oltre che da fattori ormonali e paracrini, come la gastrina, l'istamina, la grelina e la somatostatina, anche da fattori neuronali e da stimoli meccanici e chimici, quali la distensione della parete gastrica e l'azione di sostanze quali caffeina ed etanolo (vedi anche Capitolo 36). In particolare, i principali fattori in grado di stimolare la secrezione acida sono l'istamina,

la gastrina e l'acetilcolina (Figura 23.4). L'istamina, rilasciata dalle cellule denominate *Enterochromaffin-Like Cells* (ECL), si lega al recettore H_2 che attiva l'adenilato ciclasi e determina un aumento dell'AMPc. La gastrina, rilasciata dalle cellule G, si lega ai recettori CCK2, che attivano la fosfolipasi C e inducono il rilascio di Ca^{2+} nel citosol. La gastrina è inoltre in grado di stimolare la liberazione di istamina dalle cellule ECL. L'acetilcolina, rilasciata dai neuroni intramurali, si lega ai recettori M3 con conseguente aumento delle concentrazioni intracellulari di ioni Ca^{2+} . L'attivazione di questi meccanismi trasduzionali contribuisce in ultima analisi a favorire un aumento dei livelli intracellulari di cAMP e Ca^{2+} che determinano l'attivazione di chinasi intracellulari favorevoli al passaggio della pompa protonica dal citoplasma alla membrana. In condizioni di riposo, la H^+/K^+ ATPasi è contenuta prevalentemente nelle vescicole citoplasmatiche. In seguito a stimolazione, queste vescicole si fondono con la membrana plasmatica apicale determinando il disassemblaggio della pompa protonica e l'espressione in membrana della stessa. Quando lo stimolo secretorio termina, la pompa protonica viene riassorbita e il compartimento tubulo-vescicolare

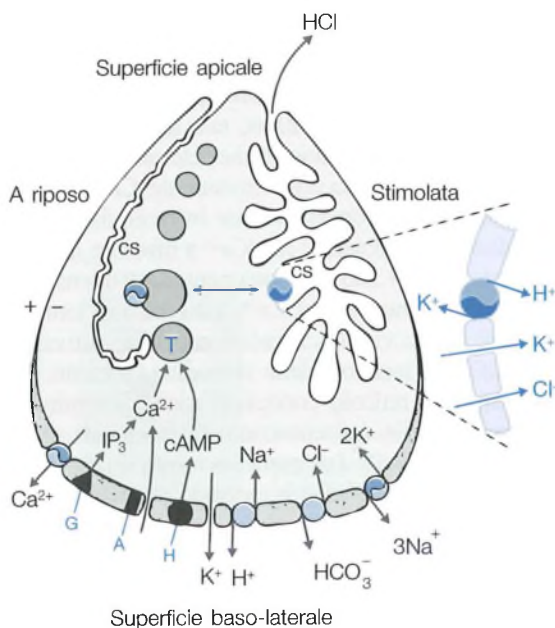


FIGURA 23.4 Modello di una cellula parietale gastrica. Nella superficie baso-laterale sono presenti: i recettori per la gastrina (G) che induce la liberazione di IP_3 e quindi di Ca^{2+} , per l'acetilcolina (A) che aumenta la permeabilità al Ca^{2+} e per l'istamina (H), che attiva la produzione di cAMP e i sistemi di trasporto come la Ca^{2+} -ATPasi, la Na^+/K^+ -ATPasi, l'antiporto Na^+/H^+ e Cl^-/HCO_3^- e un canale per il K^+ . A livello delle membrane che formano le vescicole e i canalicoli (cs, e ingrandimento) sono localizzate la H^+/K^+ -ATPasi e i canali per K^+ e Cl^- . In condizioni di non stimolazione, non vi è trasporto di H^+ in quanto manca il K^+ necessario per il funzionamento della H^+/K^+ -ATPasi. A seguito di stimolazione, gli organuli tubulo-vescicolari intracellulari si fondono con la membrana plasmatica e formano i canalicoli secretori (cs). La pompa si trova così a contatto con i liquidi extracellulari, può legare il K^+ presente nel lume gastrico e riversarvi ioni H^+ . Alimenti ricchi in K^+ (ad es. gli agrumi) stimolano l'acidificazione del succo gastrico.

viene ristabilito. I meccanismi di tali movimenti cellulari della pompa protonica coinvolgono microfilamenti, piccole molecole con attività GTPasica, clatrina e proteine di fusione. Inoltre, affinché la H^+/K^+ ATPasi possa funzionare correttamente, è necessaria anche la presenza di ioni K^+ a tale livello è rappresentata dal canale del potassio KCNQL, espresso sulla membrana cellulare delle stesse cellule.

Così come la stimolazione, anche la riduzione della secrezione acida da parte della pompa protonica è finemente regolata. Tra i fattori che riducono tale secrezione vanno menzionati la leptina, il *glucagon-like peptide* di tipo 1 e l'*Helicobacter pylori*. In particolare la regolazione della secrezione acida a opera dell'*Helicobacter pylori* avviene a livello trascrizionale, essendo tale batterio capace di inibire l'attività trascrizionale della H^+/K^+ ATPasi.

Farmaci

L'inibizione della pompa protonica rappresenta la modalità terapeutica più efficace per trattare le eventuali complicazioni dovute a ipersecrezione acida

Le due principali patologie associate all'ipersecrezione gastrica sono l'ulcera peptica e il reflusso gastroesofageo. Nei primi anni 70 è stata introdotta la prima generazione di inibitori di pompa protonica (PPI), quando si è visto che un derivato del composto tioacetamidico denominato CMN 131 possedeva proprietà antisecretorie. Ulteriori sviluppi di questa classe di composti hanno portato alla sintesi dell'omeprazolo, commercializzato a partire dal 1980 e che rappresenta oggi il farmaco più comunemente utilizzato per trattare l'ulcera peptica e il reflusso gastroesofageo. Il legame di questi derivati benzimidazolici alla porzione extracellulare della pompa protonica richiede l'acidificazione dell'ambiente circostante ed è irreversibile. Infatti, gli inibitori di pompa protonica devono essere convertiti nella propria forma attiva dal basso pH presente a livello gastrico prima di potersi legare ai residui di cisteina presenti sul lato extracellulare della H^+/K^+ ATPasi. A causa di tale meccanismo di attivazione si osserva un tempo di latenza tra l'assunzione del farmaco e la risposta allo stesso. Per tale ragione sono stati sintetizzati nuovi composti in grado di poter essere attivati anche a valori di pH più elevati SCH28080, essendo in tal modo capaci di avere un'azione più veloce e indipendente dall'acidità gastrica. Successivamente è stata sintetizzata una nuova classe di inibitori, i bloccanti acidi competitivi con il potassio (PCAB) che agiscono come antagonisti degli ioni K^+ sulla H^+/K^+ ATPasi, legandosi reversibilmente alla pompa sul lato luminale della membrana. I PCAB agiscono più velocemente degli inibitori di pompa dal momento che non richiedono una preventiva attivazione. Tuttavia, a causa del legame non-covalente alla H^+/K^+ ATPasi, sono necessari dosaggi più alti di tali farmaci per avere un effetto di blocco paragonabile a quello ottenuto con omeprazolo e derivati. Ciononostante, i PCAB, come il soraprazan, rappresentano una promettente classe di composti per trattare patologie associate all'ipersecrezio-

ne acida gastrica. Altri inibitori della pompa protonica includono l'acido scopadulcico di tipo B, ottenuto dalla pianta centroamericana *Scoparia dulcis*, e i suoi derivati, che hanno anche attività antivirale, e l'antiaritmico di classe I cibenzolina.

L'impiego dei composti che riducono l'attività della pompa protonica dovrebbe tener conto delle conseguenze del sovradosaggio che può comportare una ipergastrinemia compensatoria che, se prolungata, determina una iperplasia delle cellule parietali ed enterocromaffini. Le conseguenze cliniche consistono in una secrezione acida di rimbalzo che può indurre sintomi dispeptici in soggetti sani ed esacerbare i sintomi in pazienti affetti da reflusso gastroesofageo o ulcera peptica.

Ca²⁺ATPasi della membrana plasmatica

La Ca²⁺ATPasi è deputata al trasporto di ioni Ca²⁺ dal citosol allo spazio extracellulare

Il corretto funzionamento delle Ca²⁺ATPasi della membrana plasmatica (PMCA) è di vitale importanza per mantenere, in cooperazione con lo scambiatore Na⁺/Ca²⁺, le concentrazioni citosoliche di Ca²⁺ in ambito fisiologico in tutte le cellule eucariotiche.

La PMCA è una proteina integrale di membrana appartenente alla famiglia delle ATPasi di tipo P ed è espressa in tutti i tessuti del corpo umano, compreso quello cerebrale. L'energia per l'estruzione di ioni Ca²⁺ deriva dall'idrolisi dell'ATP con una stechiometria di uno ione Ca²⁺ rimosso per ogni molecola di ATP idrolizzata. Questo trasportatore lega il Ca²⁺ con un'alta affinità, K_d 100-200 nM, ma con una ridotta V_{max}, al contrario di NCX che possiede bassa affinità e alta capacità per il Ca²⁺. L'affinità della PMCA per il Ca²⁺ può essere ulteriormente aumentata di 20-30 volte dal legame della Ca²⁺/calmodulina.

A livello del SNC, la PMCA, oltre a essere coinvolta nella regolazione del Ca²⁺ intracellulare, è anche implicata nella regolazione dell'attività sinaptica; in particolare essa gioca un ruolo chiave nel rilascio di neurotrasmettitori dalle vescicole sinaptiche.

Dal punto di vista topologico, la PMCA, dotata di un peso molecolare di circa 134 kDa, è costituita da 10 segmenti transmembrana con i segmenti C ed N terminali localizzati all'interno del citoplasma. A livello del segmento C terminale vi è una lunga coda di 70-200 amminoacidi che prende parte alla regolazione della pompa (Figura 23.5). Sono state finora identificate 4 isoforme della PMCA (PMCA1-4), espresse in differenti tessuti e codificate da 4 geni diversi, denominati ATP2B1-4. Tali proteine vanno incontro a fenomeni di *splicing* alternativo che possono condurre a oltre 20 varianti di *splicing*.

PMCA1 è una proteina ubiquitaria, la sua assenza non è compatibile con la vita. PMCA2 e PMCA3 sono espresse principalmente a livello del sistema nervoso centrale e muscolare. PMCA4 è un'altra isoforma ubiquitaria; la sua assenza pur essendo compatibile con la vita determina infertilità nei maschi. PMCA2 e PMCA3 sono attivate

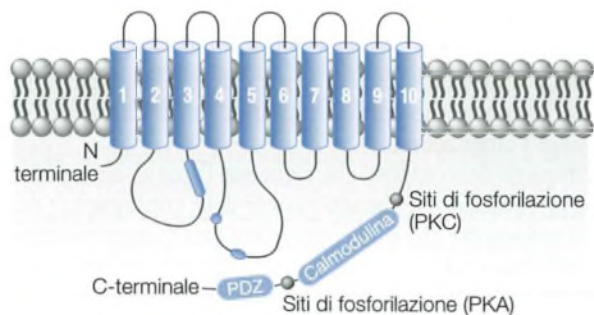


FIGURA 23.5 Struttura della Ca^{2+} ATPasi della membrana plasmatica. Essa è costituita da 10 segmenti transmembrana con i segmenti C ed N terminali localizzati all'interno del citoplasma. A livello del segmento C terminale vi è una lunga coda di 70-200 amminoacidi avente funzione regolatoria. Tale porzione presenta siti di fosforilazione, siti di legame per la calmodulina e siti di legame PDZ.

molto più velocemente rispetto alle altre due isoforme; ciò assume rilevanza in quelle cellule che, se eccitate, permettono l'influsso di elevate quantità di ioni Ca^{2+} , come avviene a livello del SNC e del sistema muscolare, dove tali isoforme sono espresse in misura maggiore. L'importanza della PMCA è testimoniata dal fatto che la compromissione di questo trasportatore di membrana è spesso associata a patologie quali sordità neurosensoriale, diabete, ipertensione e ischemia cerebrale.

Farmaci

Non esistono farmaci selettivi per inibire o attivare la PMCA, tuttavia nelle ricerche precliniche sono stati utilizzati l'o-vanadato (1-5 mM) e l'eosina (1,5-10 μM); due composti che agiscono inibendo la PMCA a concentrazioni elevate e in maniera non selettiva.

ER Ca^{2+} ATPasi

Gli ER Ca^{2+} ATPasi (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase, SERCA) giocano un ruolo rilevante nel mantenimento dell'omeostasi del Ca^{2+} a livello del reticolo endoplasmatico e a livello del citoplasma della cellula

Il reticolo endoplasmatico (RE) rappresenta il più esteso organello intracellulare, costituito da un sistema di microtubuli e cisterne organizzati in una rete complessa. All'interno del reticolo endoplasmatico avviene una serie di processi cellulari critici, quali la sintesi e il trasporto proteico. Inoltre, il RE è il principale sito di sintesi di fosfolipidi, fosfatidilinositolo e leucotrieni. Oltre che in questi importanti meccanismi di sintesi e trasporto, il RE prende parte anche a fenomeni di ricezione e di produzione di segnali di cruciale importanza per l'attività e la sopravvivenza cellulare. In particolare, dal momento che il RE rappresenta il più grande sistema di deposito di Ca^{2+} in grado di generare flussi di ioni Ca^{2+} tra il citosol e il lume del RE in risposta alla stimolazione extracel-

lulare, esso è coinvolto in tutti quei meccanismi attivati dall'aumento del Ca^{2+} intracellulare (vedi Capitolo 9).

I movimenti di Ca^{2+} all'interno del RE sono inoltre importanti per le attività del RE stesso, dal momento che ioni Ca^{2+} liberi nel lume del RE controllano la sintesi e l'assemblaggio proteico.

L'omeostasi del Ca^{2+} a livello del reticolo è controllata da numerosi sistemi molecolari, in grado di mediare i flussi ionici attraverso le endomembrane. Questi sistemi comprendono:

- la famiglia di Ca^{2+} ATPasi presenti sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico denominate SERCA;
- i canali per il rilascio di Ca^{2+} intracellulare, che comprendono i recettori per la rianodina, i recettori per l'inositolo 1,4,5-trifosfato e probabilmente altri canali permeabili al Ca^{2+} come i recettori TRPV1;
- i canali ionici che contribuiscono al mantenimento del potenziale di membrana del RE controbilanciando le correnti prodotte dal rilascio di Ca^{2+} dai depositi. La natura di questi canali è in massima parte sconosciuta, tuttavia i canali cationici trimerici intracellulari (TRIC) sembrano avere un ruolo importante in tale processo.

Struttura

Nei vertebrati, le pompe appartenenti alla famiglia delle SERCA sono codificate da tre distinti geni, e ciascuno dei tre geni possiede numerose varianti di *splicing*. Tali geni sono denominati ATP2A1-3 e codificano, rispettivamente, per le proteine SERCA1a/b, SERCA2a/b e SERCA3a/b/c/d/e.

La struttura delle SERCA comprende 4 domini. Un dominio transmembrana o dominio M costituito da 10 segmenti transmembrana che contiene i siti di legame del Ca^{2+} ; e tre domini citoplasmatici denominati dominio A, P e N. Il dominio A, attuatore, e il dominio P, di fosforilazione, sono accoppiati al dominio M, mentre il dominio N, o dominio legante i nucleotidi, è legato al dominio P (Figura 23.6).

Distribuzione tessutale e cellulare

Le pompe della famiglia SERCA sono distribuite in maniera ubiquitaria in tutte le cellule dell'organismo

Differenze si riscontrano nella distribuzione delle diverse isoforme di SERCA.

SERCA1a è espressa in maniera predominante a livello muscolare, l'isoforma di *splicing* SERCA1b rappresenta la forma di *splicing* alternativo neonatale.

La SERCA2a è espressa soprattutto a livello del muscolo striato e cardiaco. Al contrario, l'isoforma SERCA2b è distribuita in maniera ubiquitaria in tutte le cellule. Il ruolo di SERCA3 non è stato ancora definito e la sua ablazione genetica non determina conseguenze fenotipiche chiare, a eccezione di deficit di minore importanza nei meccanismi di rilasciamento della muscolatura liscia della trachea e dei vasi. Tale isoforma di SERCA è espres-

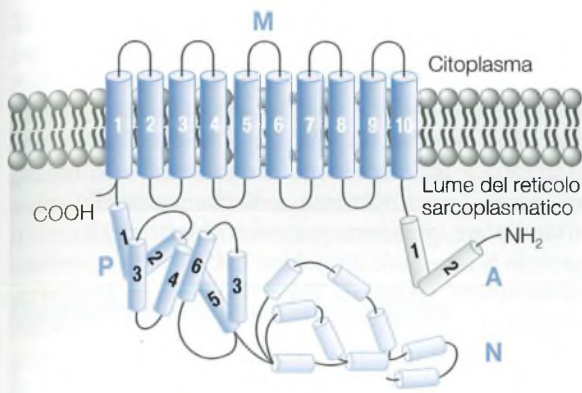


FIGURA 23.6 Struttura della Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico (SERCA). La struttura delle SERCA comprende 4 domini. Un dominio transmembrana o dominio M costituito da 10 segmenti transmembrana che contiene i siti di legame del Ca^{2+} , e tre domini citoplasmatici denominati domini A, P e N. Il dominio A, attuatore, e il dominio P, di fosforilazione, sono accoppiati al dominio principale, M, mentre il dominio N, o dominio legante i nucleotidi, è legato al dominio P.

sa in misura maggiore a livello intestinale, polmonare e nella milza, nell'endotelio e nel tessuto ematopoietico.

Meccanismi regolatori e proprietà fisiologiche

Gli ioni Ca^{2+} presenti all'interno del RE rappresentano il principale meccanismo di regolazione della pompa SERCA

In particolare, l'aumento delle concentrazioni intravesicolari di Ca^{2+} è in grado di inibire efficacemente l'ingresso di Ca^{2+} nel RE. Al contrario, la diminuzione della concentrazione intravesicolare di ioni Ca^{2+} ne favorisce l'ingresso.

Questa peculiare regolazione coinvolge l'interazione tra la pompa SERCA e due proteine denominate calreticulina ed Erp57. Ad alte concentrazioni di Ca^{2+} intravesicolare la calreticulina forma un complesso con Erp57 che inibisce l'attività di SERCA. Il complesso calreticulina-Erp57 si dissocia in seguito ad abbassamento delle concentrazioni intravesicolari di Ca^{2+} , determinando un aumento dell'attività della pompa.

Il RE svolge un ruolo duplice nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} essendo allo stesso tempo un deposito e una fonte di ioni Ca^{2+} per l'ambiente citoplasmatico. Le pompe SERCA provvedono al mantenimento di questa duplice funzione, estraendo Ca^{2+} quando le concentrazioni intravesicolari sono alte e facendo entrare Ca^{2+} quando le concentrazioni all'interno del RE sono basse. Il ruolo delle SERCA è particolarmente importante in tutti i processi dell'organismo, dal momento che lo ione Ca^{2+} rappresenta un secondo messaggero di rilievo per lo svolgimento delle diverse funzioni. In tal senso, il ruolo delle SERCA risulta essere di notevole importanza in quelle patologie quali l'infarto del miocardio, l'ischemia cerebrale e altre patologie che coinvolgono una modifica nelle concentrazioni intracellulari di ioni Ca^{2+} .

Modulazione farmacologica

Numerosi composti inibiscono le SERCA ma non sono utilizzabili terapeuticamente

Non sono disponibili famiglie di farmaci in grado di modulare l'attività SERCA e utilizzabili in terapia. Tuttavia, sono stati identificati alcuni composti (la tapsigargina, l'acido ciclopiazonico e il 2,5-di-(t-butil)-diidrossibenzene) in grado di inibire SERCA con elevata potenza e selettività.

La tapsigargina è il più potente inibitore di SERCA descritto finora. Il prodotto naturale è stato inizialmente estratto dalla *Thapsia garganica*, una pianta usata nella medicina araba da più di 2000 anni. Diversi studi hanno dimostrato che la tapsigargina, bloccando le SERCA, può indurre morte apoptotica in diversi tipi di cellule tumorali. Dal momento che la tapsigargina blocca la pompa SERCA presente sul RE in tutte le cellule, essa ha un elevato grado di citotossicità, dovuta al depauperamento del Ca^{2+} presente nel RE e alla conseguente attivazione delle caspasi e all'induzione di stimoli apoptotici. Tuttavia tale azione non è specifica per alcuni tipi cellulari e pertanto la sua attività farmacologica non può essere sfruttata in chemioterapia antineoplastica.

Per altri composti in grado di inibire la pompa SERCA, come ad esempio per i derivati dell'acido ciclopiazonico, sono state proposte delle azioni protettive in patologie quali l'ischemia del miocardio. Il meccanismo alla base di tale effetto non è stato ancora completamente chiarito, ma è indubbio che la modulazione dell'attività di SERCA influenza il ciclo contrazione/rilascio muscolare.

È stato recentemente dimostrato che l'agente antimalarico artemisinina è in grado di esercitare la propria azione inibendo l'ortologo di SERCA espresso nelle cellule di *Plasmodium falciparum*, il parassita che causa la malaria. Numerosi composti attualmente utilizzati in terapia hanno mostrato attività inibitoria sulla pompa SERCA. Il numeroso elenco comprende derivati macrolattionici, quali gli agenti immunosoppressivi rapamicina e ciclosporina, l'antinfiammatorio inibitore delle COX2 celecoxib, l'agente antielmintico ivermectin e l'estrogeno sintetico dietilstilbestrolo. Tuttavia non è stato ancora chiarito se il loro effetto terapeutico sia in parte dovuto al blocco delle SERCA, o se tale proprietà farmacologica rappresenti solamente un effetto secondario.

Scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) contribuisce in modo sostanziale a mantenere il gradiente di concentrazione di Ca^{2+} a cavallo della membrana plasmatica

Esso appartiene alla superfamiglia delle proteine di membrana Ca^{2+} /catione comprendente i seguenti gruppi:

1. la famiglia NCX, che scambia 3 ioni Na^+ per 1 ione Ca^{2+} ;
2. la famiglia $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger K^+ -dipendente (NCKX), che scambia 4 ioni Na^+ per 1 Ca^{2+} più 1 ione K^+ ;

3. la famiglia batterica che promuove lo scambio $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (YRBG);
4. la famiglia non batterica $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ che costituisce lo scambiatore di Ca^{2+} dei vacuoli dei lieviti (CAX);
5. la famiglia dello scambiatore $\text{Ca}^{2+}/\text{catione}$ (CCX), a cui appartiene un trasportatore precedentemente denominato scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-Li}^+$ (BCLX o NCKX6).

Lo scambiatore della membrana plasmatica $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, appartenente alla prima famiglia, è un trasportatore ad alta capacità e bassa affinità ionica che scambia 3 ioni Na^+ per 1 ione Ca^{2+} . Quando le concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, aumentano e la cellula richiede che esse ritornino ai livelli di base, NCX accoppia l'estrusione contro gradiente di ioni Ca^{2+} all'ingresso di ioni Na^+ nella cellula secondo il suo gradiente elettrochimico; tale modo di operare è definito come efflusso di Ca^{2+} o "forward mode", e contribuisce a mantenere un gradiente di 10^4 volte di differenza di concentrazioni di Ca^{2+} ai due lati della membrana. In altre condizioni fisiologiche o fisiopatologiche, allorché le concentrazioni di Na^+ intracellulari, $[\text{Na}^+]_i$, aumentano o si verifica la depolarizzazione di membrana, condizioni in cui vi è una riduzione del gradiente elettrochimico transmembrana dell' Na^+ , NCX inverte il suo modo di operazione e media l'estrusione di Na^+ e l'influsso di ioni Ca^{2+} ; questa modalità di funzionamento viene definita come influsso di Ca^{2+} , o "reverse mode".

Da tali considerazioni emerge come la modalità di operazione di NCX dipenda da: 1. il gradiente transmembrana di Na^+ ; 2. il gradiente transmembrana di Ca^{2+} ; 3. il potenziale di membrana.

Struttura

Tre geni distinti localizzati rispettivamente sui cromosomi 2, 19 e 14, codificano per tre differenti proteine: NCX1, NCX2 ed NCX3. Ciascun gene può dar luogo a numerose varianti di *splicing*. Difatti sono state descritte 15 varianti di *splicing* per NCX1 e 6 per NCX3, tali isoforme sono caratterizzate da un'omologia di sequenza di circa il 70%. Nonostante questa alta omologia di sequenza, le tre proteine differiscono per caratteristiche biochimiche, distribuzione tessutale e cellulare. Sono conosciuti tre promotori di NCX espressi nel cuore, nel cervello e nel rene, denominati rispettivamente *Hrncx*, *Brncx*, *Kdncx*. I promotori di NCX sono regolati da numerosi fattori trascrizionali quali NF- κB , HIF1, AP-2, *cAMP Response Element* (CRE) e *Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator* (DREAM).

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX1

è una proteina con 9 segmenti transmembrana

È dotato di un peso molecolare di 120 kDa, è costituito da 938 amminoacidi organizzati in 9 segmenti transmembrana (TMS1-9) che possono essere divisi in un dominio N terminale idrofobico composto dai primi 5 TMS, TMS1-5, e in un dominio idrofobico C terminale composto dagli ultimi 4 TMS, TMS6-9 (Figura 23.7). Le

isoforme NCX2 ed NCX3 sono costituite da 921 e 927 amminoacidi con un peso molecolare di 102 e 105 kDa, rispettivamente. La sequenza amminoacidica di NCX compresa tra TMS2 e TMS3 è denominata α_1 -repeat, laddove la regione tra TMS7 e TMS8 è denominata α_2 -repeat. Le regioni denominate α_1 -repeat e α_2 -repeat, localizzate rispettivamente a livello extracellulare e intracellulare, prendono parte al trasporto degli ioni. Il dominio N terminale idrofobico TMS1-TMS5 è separato dal dominio C terminale TMS6-TMS9 da un *loop* intracellulare, *f loop*, costituito da circa 500 amminoacidi, avente funzioni regolatorie e non coinvolto nel trasporto ionico. La regolazione dell'attività di NCX avviene grazie all'azione diretta di numerose molecole che si legano su specifici siti di legame presenti sull'*f loop*. Tra le molecole che regolano l'attività di NCX vanno menzionate le concentrazioni degli ioni Ca^{2+} e Na^+ , il pH intracellulare, l'ossido nitrico (NO), la proteinchinasi C, la proteinchinasi A, l'ATP e il fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PIP₂). Per quanto concerne la regolazione da parte del Ca^{2+} intracellulare, all'interno dell'*f loop* sono stati identificati due domini stimolatori denominati *Calcium Binding Domain 1 e 2* (CBD1 e CBD2). Ciascun sito CBD lega due ioni Ca^{2+} . CBD1 mostra alta affinità per il Ca^{2+} con una K_d di 120-400 nM e rappresenta il principale sensore per il Ca^{2+} dal momento che esso è sensibile a piccoli aumenti di Ca^{2+} citoplasmatico, che inducono variazioni conformazionali in grado di attivare lo scambiatore. Al contrario, CBD2 mostra una bassa affinità per il Ca^{2+} , con una K_d compresa tra 820 nM e 8,6 mM. Di conseguenza quest'ultimo sito CBD2 lega il Ca^{2+} solo quando le concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} raggiungono valori molto elevati e induce quindi variazioni conformazionali modeste. Queste due differenti soglie di sensibilità fanno sì che NCX possa funzionare in maniera dinamica nell'ambito di un grande ambito

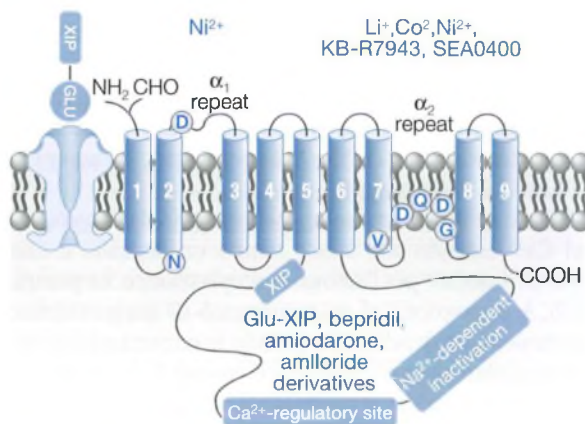


FIGURA 23.7 Struttura dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX. Le regioni α_1 -repeat e α_2 -repeat prendono parte al trasporto degli ioni. Il dominio N terminale idrofobico TMS1-TMS5 è separato dal dominio C terminale TMS6-TMS9 da un *loop* intracellulare, *f loop*, avente funzioni regolatorie e non coinvolto nel trasporto ionico. Nella figura sono rappresentati i siti di legame dei più comuni agenti farmacologici che interagiscono con NCX.

di concentrazioni di Ca^{2+} permettendone l'ingresso o l'uscita nelle cellule eccitabili.

Inoltre, sempre a livello dell'f loop il fattore lipidico PIP_2 attiva NCX legandosi a una regione di 20 amminoacidi presente sulla porzione N terminale dell'f loop, denominata "exchange inhibitory peptide" (XIP). In tal modo PIP_2 elimina l'inibizione di NCX mediata dall' Na^+ intracellulare, determinando così un'attivazione di NCX.

Distribuzione tessutale e cellulare

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ è presente virtualmente in tutte le cellule

NCX1 è pressoché ubiquitario, essendo espresso in numerosi tessuti quali il sistema nervoso centrale, il cuore, il muscolo scheletrico, il muscolo liscio, il rene, l'occhio, il sistema immunitario e le cellule ematiche. Differentemente da NCX1, NCX2 ed NCX3 sono espressi esclusivamente a livello neuronale e del muscolo scheletrico. Infine, NCX1 e NCX3 danno luogo a numerose varianti di *splicing* che sono espresse selettivamente in diverse regioni e popolazioni cellulari del sistema nervoso centrale. Nella cellula, NCX si localizza a livello mitocondriale e a livello nucleare, ma il suo ruolo a livello di tali organelli è in corso di determinazione.

Proprietà biofisiche ed elettrofisiologiche

NCX ha una stechiometria di 3 ioni Na^+ per 1 ione Ca^{2+} . Tale trasportatore presenta un'affinità per lo ione Ca^{2+} 10 volte inferiore a quella della pompa Ca^{2+} -ATPasi, ciononostante quando è attivato al massimo della sua capacità mostra una portata elevatissima, risultando 10-50 volte superiore a quella della pompa di membrana Ca^{2+} -ATPasi. Si tratta dunque di un sistema di efflusso cellulare del Ca^{2+} caratterizzato da una bassa affinità per tale ione ma da una elevatissima capacità di trasporto.

Una densità di circa 400 molecole di scambiatore per mm^2 di membrana plasmatica genera una corrente di 30 pA/F. La direzione dell'ampiezza della corrente generata dipende dal potenziale cellulare di membrana (V_m) e dai gradienti dell' Na^+ e del Ca^{2+} . Tali gradienti definiscono il potenziale di reversione di NCX (E_{NCX}) che rappresenta il valore di V_m al quale NCX inverte il proprio modo di funzionamento.

La direzione delle correnti di NCX (I_{NCX}) dipende dalla differenza tra E_{NCX} e il potenziale di membrana cellulare. Quando V_m è più negativo di E_{NCX} , NCX lavora nel forward mode, estraendo Ca^{2+} ; al contrario, quando il valore di V_m è più positivo di E_{NCX} , NCX opera nel reverse mode, favorendo l'ingresso di ioni Ca^{2+} . Dal momento che in cellule eccitabili a riposo V_m è circa 60 mV e E_{NCX} è circa 40 mV, NCX in condizioni fisiologiche favorisce l'efflusso di ioni Ca^{2+} e l'influsso di ioni Na^+ .

L'ampiezza di I_{NCX} dipende dalla differenza tra V_m ed E_{NCX} oltre che da molti fattori regolatori quali la presenza di molecole inibitorie, lo stato di fosforilazione o l'interazione con altre proteine.

Fisiologia

NCX controlla la ripolarizzazione delle cellule cardiache susseguente alla contrazione cardiaca

La contrazione delle fibrocellule muscolari che determina il fisiologico battito cardiaco è fortemente influenzata dalle concentrazioni intracellulari di ioni Ca^{2+} . Tale ione può entrare nella cellula attraverso i canali del Ca^{2+} sensibili al voltaggio (VOCC), oppure può essere rilasciato dal reticolo sarcoplasmatico attraverso i canali della rianodina attivati dallo ione Ca^{2+} . Affinché l'omeostasi dello ione Ca^{2+} venga mantenuta e per assicurare il rilassamento della muscolatura cardiaca susseguente alla contrazione, è necessaria la presenza di meccanismi di estrusione di ioni Ca^{2+} . Tra i meccanismi di efflusso del Ca^{2+} presenti a livello della membrana cellulare cardiaca, NCX svolge un ruolo principale dal momento che, operando nel "forward mode", regola le concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} e di conseguenza la successiva contrattilità cardiaca.

Il ruolo fisiologico di NCX operante nel "reverse mode" è ancora in discussione, ma esso è coinvolto nel meccanismo di azione dei glicosidi cardiotonici che bloccando la Na^+/K^+ -ATPasi inducono un aumento di Na^+ intracellulare che attiva NCX nel "reverse mode" inducendo un efflusso di Na^+ e un influsso di Ca^{2+} . Tale meccanismo determina in ultima analisi l'effetto inotropo positivo tipico di tale classe di farmaci (vedi CD: Approfondimento 23.2).

A livello delle cellule della muscolatura liscia, NCX promuoverebbe un effetto miorelaxante grazie alla riduzione dei livelli di Ca^{2+} intracellulari ottenuti lavorando in modalità "forward".

Un altro tessuto che esprime alte concentrazioni di NCX è il tessuto renale. In particolare, NCX è coinvolto non solo nel riassorbimento di Ca^{2+} a livello del tubulo contorto distale e del tubulo contorto prossimale, ma esso contribuisce anche al mantenimento dell'omeostasi ionica a livello del tratto ascendente dell'ansa di Henle (vedi CD: Approfondimento 23.3).

NCX controlla la depolarizzazione cellulare

Importante pare essere il ruolo di NCX a livello delle cellule β del pancreas, dove tale trasportatore favorirebbe il rilascio di insulina.

Per quanto concerne il ruolo di NCX nel sistema nervoso centrale, è necessario innanzitutto sottolineare il fatto che il tessuto cerebrale è l'unico a esprimere oltre l'isoforma ubiquitaria NCX1, anche NCX2 e NCX3. Queste tre isoforme possono essere espresse nello stesso tipo di cellule cerebrali. Nel SNC, NCX contribuisce al mantenimento dell'omeostasi ionica, controlla la depolarizzazione cellulare e il rilascio di neurotrasmettitori. Infine, NCX entra in gioco nei processi fisiologici correlati all'apprendimento e alla memoria a breve e lungo termine.

Fisiopatologia

NCX è importante nell'ischemia cardiaca e cerebrale

In considerazione dell'importante ruolo svolto da NCX nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare degli

ioni Na^+ e Ca^{2+} , è intuitivo supporre che cambiamenti nell'espressione e nell'attività di tale trasportatore possano prendere parte agli aspetti fisiopatologici di numerose patologie umane.

A livello cardiaco, la mancata espressione di NCX1 negli animali migliora le condizioni susseguenti all'ischemia del miocardio e riduce la frequenza di comparsa di aritmie. L'iperespressione di NCX1 migliora lo scompenso cardiaco. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che, in alcuni tipi di ipertensione, l'iperattività di NCX1, nella modalità di influsso di Ca^{2+} , promuoverebbe l'aumento della pressione sanguigna, inducendo vasostrizione delle fibrocellule muscolari susseguente all'ingresso di Ca^{2+} .

Nelle malattie neurodegenerative, quali l'ischemia cerebrale, NCX ha un ruolo fortemente neuroprotettivo. Infatti, il blocco farmacologico di NCX o la sua eliminazione geneticamente determinata comportano un aggravamento delle conseguenze dell'ischemia cerebrale indotta sperimentalmente in animali da laboratorio (vedi **CD**: Approfondimento 23.4. *Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ come nuovo bersaglio molecolare per lo sviluppo di farmaci utili per il trattamento dell'ischemia cerebrale*).

Farmaci in grado di modulare l'attività di NCX

Negli ultimi anni è stato riservato un grande interesse all'identificazione di molecole in grado di modulare efficacemente l'attività di NCX. La ragione di questo enorme interesse risiede nella speranza di identificare molecole efficaci per il trattamento di patologie come l'ischemia cerebrale, l'ischemia cardiaca, l'ipertensione, l'aritmia, per le quali modifiche dell'attività di NCX potrebbero determinare un effetto protettivo.

Più di 50 anni fa l'amiloride e i suoi derivati sono stati descritti come potenti inibitori dei canali del Na^+ espressi a livello dell'epitelio urinario agendo come diuretici risparmiatori di K^+ . Successivamente si è visto che tali composti erano in grado di agire anche sullo scambiatore Na^+/H^+ e sullo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Per tale ragione partendo dall'amiloride sono state sintetizzate due classi di composti in grado di bloccare NCX, derivati guanidinici e derivati benzamili. Nell'ambito di quest'ultima classe di composti, il derivato clorobenzil-dimetilbenzamide (CB-DMB) ha mostrato le caratteristiche di maggiore selettività verso NCX.

Negli ultimi 40 anni numerosi nuovi composti in grado di interferire con l'attività di NCX sono stati identificati, tra questi vi sono *derivati pirrolidinici* come il bepridil, *derivati benzofuranici* come l'amiodarone. Più recentemente, sono stati sintetizzati *derivati isotioureici*, come il KB-R7943, in grado di inibire selettivamente NCX operante nel reverse mode e nuove più potenti e selettive molecole appartenenti alla classe delle *etossianiline* quali il SEA0400, e delle *tiazolidine* quali l'SN-6 (Tabella 23.3). Tuttavia, spesso tali composti oltre ad agire su NCX, sono anche in grado di interferire con altri trasportatori di membrana e canali ionici.

TABELLA 23.3 Principali classi di inibitori dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Derivati dell'amiloride	CB:DMB, DCB, DMB
Derivati pirrolidinici	Bepridil
Derivati isotioureici	KB-R7943
Etossianiline	SEA-0400
Derivati benzofuranici	Amiodarone
Derivati chinazolinonici	SM-15811
Derivati tiazolidinici	SN-6
Derivati fenossipiridinici	JP11092454
Derivati nicotinamidici	6-{4-[(3-fluorobenzil)-ossi]fenossi} nicotinamide
Derivati piperidinici	TM-252077
Derivati acetamidici	YM-270951
Peptidi	XIP, Glu-XIP, FMRFa, FRCRCF
Small Interference RNA	siRNA-NCX1, siRNANCX1, siRNA-NCX3
Oligodeossinucleotidi antisenso	AS-NCX1, AS-NCX2, AS-NCX3
Cationi inorganici	Ni^{2+} , La^{2+} , Gd^{2+}

Per una classificazione sistematica dei composti finora identificati in grado di modulare l'attività di NCX è importante tenere conto: 1. della specificità di azione verso una determinata isoforma, dal momento che alcuni composti sono in grado di inibire meglio un'isoforma rispetto a un'altra; 2. della selettività per il modo di funzionamento di NCX, difatti alcuni composti agiscono meglio sul reverse mode; 3. del sito di legame di tali composti sullo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Alla luce di tali considerazioni è necessario che siano sviluppati farmaci capaci di agire selettivamente su una delle 3 isoforme di NCX e farmaci capaci di svolgere la propria attività sulle due modalità di funzionamento dello scambiatore.

Scambiatore Na^+/H^+

Lo scambiatore Na^+/H^+ (NHE) media il trasporto di H^+ contro Na^+

La famiglia dello scambiatore è costituita da un gruppo di proteine integrali di membrana che mediano il controtrasporto elettroneutro di 1 ione H^+ presente nell'ambiente intracellulare per 1 ione Na^+ presente nello spazio extracellulare. Nel compiere tale trasporto, NHE regola il pH intracellulare e il volume della cellula.

Sino a oggi sono state clonate nove isoforme di NHE; esse presentano un'omologia strutturale compresa tra il 25 e il 70% e condividono la struttura secondaria. Queste isoforme differiscono per la distribuzione tissutale e subcellulare, per le proprietà cinetiche, per le funzioni fisiologiche e per la sensibilità all'effetto dei farmaci inibitori. NHE1 è l'isoforma di NHE più studiata, per le sue numerose implicazioni fisiopatologiche.

Struttura

Il gene correlato a NHE1, localizzato sul cromosoma umano 1p36.1-p35, è costituito da circa 70 kb e consiste di 12 esoni e 11 introni. Il promotore di NHE1 è regolato da numerosi fattori trascrizionali, quali AP-1, AP-2, C/EBP, e risponde alle specie radicali dell'ossigeno (ROS), per cui condizioni, quali il danno ischemico in cui si ha un aumento dei ROS influenzano l'espressione dell'antiporter. È un trasportatore di membrana costituito da 815 amminoacidi con un peso molecolare di 85 kDa. L'analisi topologica ha permesso di stabilire che NHE1 è costituito da due domini, un dominio amfipatico di membrana N-terminale di circa 500 amminoacidi e un dominio idrofilico citoplasmatico C-terminale di circa 315 amminoacidi. Il dominio N-terminale è costituito da 12 segmenti transmembrana ed è coinvolto nel passaggio degli ioni Na^+ e H^+ , inoltre tale dominio costituisce il sito di legame per la maggior parte dei farmaci che agiscono su tale proteina. Il dominio C-terminale possiede importanti funzioni regolatorie; all'interno di tale dominio è presente un sensore per gli ioni H^+ (Figura 23.8).

Distribuzione cellulare e tessutale

NHE1 è espresso in maniera ubiquitaria sulla membrana plasmatica di tutte le cellule

In alcuni tipi cellulari, NHE1 non è distribuito uniformemente su tutta la membrana plasmatica ma si accumula in maniera preferenziale a livello di alcuni microdomini: ad esempio, lo si trova a livello della membrana basolaterale di cellule epiteliali polarizzate, a livello dei dischi intercalati e dei tubuli trasversi dei cardiomiociti e a livello delle protrusioni di membrana nelle fibrocellule.

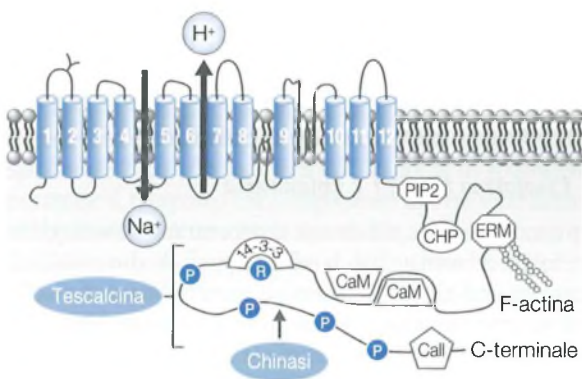


FIGURA 23.8 Struttura dello scambiatore Na^+/H^+ (NHE). NHE è costituito da due domini: un dominio amfipatico transmembrana N-terminale di circa 500 amminoacidi e un dominio idrofilico citoplasmatico C-terminale di circa 315 amminoacidi. Il dominio N-terminale è costituito da 12 segmenti transmembrana ed è coinvolto nel passaggio degli ioni Na^+ e H^+ ; inoltre tale dominio costituisce il sito di legame per la maggior parte dei farmaci che agiscono su tale proteina. Il dominio C-terminale possiede importanti funzioni regolatorie: all'interno di tale dominio è presente un sensore per gli ioni H^+ .

Proprietà biofisiche ed elettrofisiologiche

Il flusso ionico elettroneutro è generato attraverso NHE1 da un gradiente di Na^+ diretto verso l'interno e da un gradiente di H^+ verso l'esterno; per tale motivo non è richiesta energia in maniera diretta. NHE1 mostra una dipendenza dall' Na^+ extracellulare secondo la cinetica di Michaelis-Menten, con una K_m di 5-50 mM. Gli ioni Li^+ e H^+ presenti a livello extracellulare competono con l' Na^+ a livello del sito di legame per l' Na^+ ed elevate concentrazioni extracellulari di H^+ inibiscono l'attività dell'NHE1. Al contrario, l'abbassamento del pH a livello intracellulare stimola allostericamente l'attività di NHE1 con un coefficiente di Hill pari a 3.

Meccanismi regolatori e proprietà fisiopatologiche

NHE è attivato da numerosi stimoli, tra i quali il pH intracellulare, fattori di crescita, ormoni e citochine, e regola il pH, il volume e la proliferazione cellulare e l'apoptosi

In generale è possibile riassumere i meccanismi in grado di modulare NHE1 in tre categorie:

1. meccanismi di fosforilazione, operati da ERK, CaMK, MAPK e che interessano alcuni residui amminoacidici presenti a livello C terminale;
2. interazioni con proteine regolatorie;
3. modulazioni allosteriche che influenzano l'affinità degli ioni H^+ per il proprio sito di legame.

Il ruolo fisiologico di NHE1 include:

- la regolazione del pH intracellulare dal momento che NHE1 è attivato dall'acidificazione intracellulare e media l'efflusso di ioni H^+ in grado di ripristinare in maniera efficace il pH intracellulare;
- la regolazione del volume cellulare, infatti l'attività di NHE1 è stimolata dal restringimento cellulare e media l'influsso di ioni Na^+ che normalizza il volume cellulare stesso;
- la regolazione della proliferazione cellulare, poiché l'aumento del pH intracellulare indotto da NHE1 promuove la transizione dalla fase G2 alla fase M del ciclo cellulare, facilitando in tal modo la progressione del ciclo cellulare;
- la regolazione della crescita e del differenziamento cellulare;
- la regolazione del processo apoptotico;
- la regolazione del processo immunitario.

Dal momento che NHE1 svolge un ruolo importantissimo in tutte le funzioni cellulari sopra descritte, il suo corretto funzionamento è richiesto in tutte le patologie che coinvolgono variazioni di pH, dell'omeostasi ionica o del volume cellulare. In particolare, l'attività di NHE1 è fondamentale per la corretta risposta dell'organismo a stress meccanici, osmotici, o metabolici e agli stimoli ipossici o anossici. In seguito a ischemia si assiste a una

serie di eventi che comprendono l'abbassamento del pH, modifiche della forma cellulare susseguente a squilibri dell'omeostasi ionica e attivazione di chinasi. Farmaci in grado di bloccare l'attività di NHE1 sono stati valutati su pazienti affetti da ischemia del miocardio in studi clinici, che sono stati interrotti per i modesti risultati ottenuti e l'alta tossicità.

Alcuni composti in grado di inibire l'attività dello scambiatore Na^+/H^+ vengono utilizzati in clinica come diuretici risparmiatori di potassio, anche se l'effetto diuretico si verifica a dosi minori rispetto a quelle necessarie per bloccare il trasportatore NHE.

Farmaci

Gli inibitori di NHE1 vengono classificati in tre gruppi: amiloride e analoghi benzamidici; benzoilguanidine e derivati; e guanidine bicicliche

L'amiloride appartiene alla classe dei diuretici risparmiatori di potassio ed è stato il primo inibitore di NHE1 a essere stato sintetizzato. L'amiloride è un farmaco poco specifico essendo in grado di agire anche sui canali dell' Na^+ epiteliali, sullo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e sulla Na^+/K^+ ATPasi. Allo scopo di ottenere molecole più selettive sono stati sintetizzati numerosi derivati. Sostituendo l'azoto dell'amminogruppo in posizione 5', si ottengono derivati pirazinici più potenti e più selettivi dell'amiloride. Questi composti denominati con sigle includono DMA, EIPA, MIBA e HMA (vedi CD: Approfondimento 23.3).

Tra i derivati benzoilguanidinici i più rappresentativi sono l'HOE-694, il cariporide e l'eniporide. Tali composti non interferiscono con l'attività di NCX né con quella dei canali dell' Na^+ . Inoltre, i composti appartenenti a tale classe sono più efficaci nell'inibire NHE1 piuttosto che NHE3 o NHE5.

Negli ultimi decenni gli studi condotti utilizzando bloccanti dello scambiatore NHE1 in modelli animali di danno indotto da ischemia/riperfusionazione hanno dato risultati promettenti. Per tale ragione sono stati condotti studi clinici per validare l'efficacia di tali trattamenti farmacologici nei pazienti affetti da patologie conseguenti a danno da ipossia/riperfusionazione, ma i risultati ottenuti finora sono stati piuttosto deludenti e nuovi studi condotti con composti più selettivi e più potenti sono in corso di definizione.

Cotrasportatore $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$

Il cotrasportatore bumetanide-sensibile $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC) media il cotrasporto di Na^+ , K^+ e Cl^- e appartiene alla superfamiglia dei cotrasportatori catione-cloruro (CCC)

Esso media il cotrasporto elettroneutrale di 1 Na^+ , 1 K^+ e 2 Cl^- dallo spazio extracellulare allo spazio intracellulare. Tale processo può avvenire anche nella direzione opposta.

Appartengono alla superfamiglia CCC otto trasportatori

integrali di membrana e una proteina regolatrice comprendenti i cotrasportatori:

- $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC);
- K^+/Cl^- (KCC);
- Na^+/Cl^- (NCC);
- la proteina regolatrice di interazione CCC (CIP).

Per quanto concerne NKCC, sono state descritte due isoforme: l'isoforma NKCC1 è espressa in maniera ubiquitaria in tutte le cellule di mammifero, mentre NKCC2 è espressa specificamente nelle cellule renali. NKCC1, favorendo il cotrasporto di 1 K^+ , 1 Na^+ e 2 Cl^- , favorisce il mantenimento del gradiente degli ioni Cl^- in cellule eccitabili, influenzando le concentrazioni intracellulari di ioni Cl^- e contribuendo a modificare l'eccitabilità neuronale. Anche NKCC2 riveste un'importanza notevole da un punto di vista fisiologico e farmacologico, infatti il 30% del sodio filtrato dai glomeruli renali viene riassorbito grazie all'azione del NKCC2 presente nel tratto ascendente dell'ansa di Henle. Questo cotrasportatore rappresenta il bersaglio farmacologico dei diuretici dell'ansa.

Struttura

NKCC1 ed NKCC2 mostrano un'omologia di sequenza compresa tra il 70 e il 90%. Tali trasportatori sono codificati da geni localizzati, rispettivamente, sul cromosoma 15 e 5 e sono entrambi costituiti da circa 1300 amminoacidi con un peso molecolare di 130 kDa. La struttura topologica consta di 12 segmenti transmembrana fiancheggiati da due grandi estremità citoplasmatiche N e C terminali aventi funzioni regolatorie e soggette a fosforilazione da parte di chinasi (Figura 23.9).

Tra i segmenti transmembrana 7 e 8 è presente un grande loop extracellulare avente funzioni regolatorie che presenta numerosi siti di glicosilazione. La proteina può essere presente sotto forma di omodimeri che si assemblano tra loro attraverso legami tra le rispettive estremità C terminali.

Distribuzione tessutale e cellulare

■ L'isoforma NKCC1 è ubiquitaria

Le concentrazioni più elevate si riscontrano a livello della membrana basolaterale di cellule epiteliali, dove NKCC1 contribuisce al trasporto ionico transcellulare. A livello del sistema nervoso centrale, il trasportatore NKCC1 è espresso a livello neuronale, gliale ed endoteliale. Importante è la presenza di NKCC1 a livello dei neuroni sensoriali uditivi, infatti animali geneticamente modificati che non esprimono NKCC1 perdono completamente le capacità uditive.

L'altra isoforma NKCC2 è espressa, invece, solamente a livello delle cellule epiteliali renali del tratto ascendente dell'ansa di Henle.

In generale, è possibile affermare che NKCC1 è espresso in misura maggiore a livello di quelle cellule dotate di proprietà secernenti, mentre NKCC2 è espresso a livello di cellule coinvolte in fenomeni di riassorbimento.

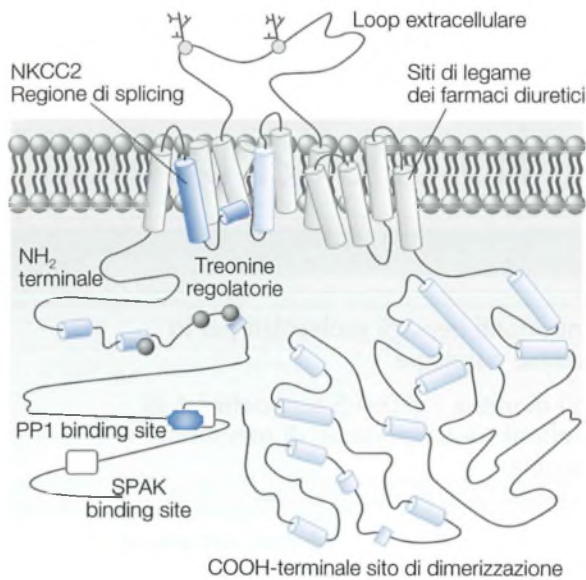


FIGURA 23.9 Struttura del cotrasportatore $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ (NKCC). La struttura topologica di NKCC consta di 12 segmenti transmembrana fiancheggiati da due grandi estremità citoplasmatiche, N e C terminali, aventi funzioni regolatorie e soggette a fosforilazione da parte di chinasi. Tra i segmenti transmembrana 7 e 8 è presente un grande loop extracellulare avente funzioni regolatorie che presenta numerosi siti di glicosilazione. La proteina può essere presente sotto forma di omodimeri che si assemblano tra loro attraverso legami tra le rispettive estremità C terminali. I cilindri bianchi rappresentano i siti d'azione dei farmaci diuretici.

Proprietà elettrofisiologiche e regolazione

Il trasporto ionico mediato da NKCC avviene se tutte e tre le specie ioniche trasportate sono presenti simultaneamente sullo stesso lato della membrana

Il trasporto ionico mediato da NKCC è elettroneutrale essendo caratterizzato da una stechiometria di $1\text{Na}^+:1\text{K}^+:2\text{Cl}^-$. Tuttavia, in particolari condizioni di persistente elevata concentrazione di Na^+ e bassa concentrazione di K^+ , NKCC può funzionare anche cotrasportando 2 ioni Na^+ e 2 ioni Cl^- . La forza di spinta che permette il trasporto contemporaneo dei tre ioni deriva dal gradiente elettrochimico combinato relativo ai tre ioni trasportati. La regolazione dell'attività di NKCC è fortemente influenzata da chinasi che fosforilano aminoacidi presenti a livello delle estremità intracitoplasmatiche N e C terminali. Importanti risvolti fisiologici e fisiopatologici derivano dalle fosforilazioni mediate dalle chinasi *Ste20-related Proline Alanine-rich Kinase* (SPAK) e da *Oxidative Stress Response kinase* (OSR1). Infatti, SPAK e OSR1 sono chinasi legate a numerosi importanti processi cellulari quali il riarrangiamento del citoscheletro, il differenziamento e la proliferazione cellulare.

Fisiologia

La localizzazione di NKCC1 in ghiandole esocrine, a livello della porzione della membrana cellulare più vicina

ai vasi sanguigni, fa sì che NKCC1 possa trasportare Na^+ , K^+ e Cl^- dal sangue nella cellula. Tale azione viene svolta in cooperazione con altri trasportatori che contribuiscono al movimento di questi soluti nella stessa direzione. Oltre che nelle ghiandole esocrine, la presenza di NKCC1 è necessaria anche a livello di altri organi quali l'orecchio interno; il corretto funzionamento di tale cotrasportatore è necessario per avere un'endolinfa cocleare ricca di ioni K^+ . Infatti, l'inibizione del cotrasportatore NKCC1 con il farmaco furosemide o con altri diuretici dell'ansa può causare sordità.

Il cotrasportatore NKCC1, regolando l'omeostasi intracellulare degli ioni Na^+ , K^+ e Cl^- a livello di cellule eccitabili tra cui le cellule neuronali, risulta inoltre essere coinvolto in fenomeni quali l'iperpolarizzazione di membrana che prende parte in molte funzioni regolate dal sistema nervoso centrale, quali memoria, apprendimento e rilascio di fattori di crescita.

Per quanto riguarda invece l'isoforma NKCC2, la localizzazione a livello della midollare renale in corrispondenza dell'ansa di Henle e dell'apparato iuxtaglomerulare, ne restringe la funzione fisiologica a fenomeni correlati al mantenimento dell'omeostasi ionica nel rene. In particolare, NKCC2 contribuisce alla regolazione del volume di liquido extracellulare e alla sua osmolarità. L'inibizione di NKCC2 a opera dei diuretici dell'ansa, quali furosemide e acido etacrinico, rappresenta il meccanismo più efficace per avere un effetto diuretico e di conseguenza un effetto antipertensivo. Ovviamente, tale effetto sarà associato a ipokalemia e ipocloremia (vedi CD: Approfondimento 23.3).

Fisiopatologia

Dal momento che NKCC è coinvolto in numerosi processi fisiologici a livello del sistema nervoso centrale e degli organi periferici, è possibile ipotizzare che modifiche nella funzione e/o nell'espressione di tali trasportatori possano essere implicate in numerose patologie. Infatti, mutazioni di NKCC1 sono state correlate allo sviluppo di alcune malattie ereditarie, quali la sindrome di Gitelman, la sindrome di Bartter di tipo I e la sindrome di Andermann. Inoltre, modifiche a carico dei meccanismi di regolazione di NKCC1 nella malattia di Gordon sembrano essere correlate ai meccanismi fisiopatologici di questa malattia ereditaria.

Infine, numerosi altri risultati sperimentali indicano che questo trasportatore è potenzialmente coinvolto in alcuni dei più importanti disordini poligenici, come l'ipertensione, l'ischemia cerebrale, l'epilessia e l'osteoporosi.

Farmaci

I farmaci in grado di inibire NKCC appartengono alla classe dei diuretici dell'ansa

Attualmente non esistono farmaci in grado di agire selettivamente su una delle due isoforme NKCC1 o NKCC2. Sono, tuttavia, disponibili alcuni composti che inibiscono le due isoforme di NKCC con potenza diversa.

Il capostipite di questa classe di farmaci è la bumetanide, la cui IC_{50} per NKCC1 e per NKCC2 è compresa tra 100 e 300 nM. Altri derivati sono la furosemide (IC_{50} 10 mM) e la piretanide (IC_{50} 1 mM).

Oltre alla proprietà di inibire l'attività di NKCC, la bumetanide e i suoi derivati sono anche in grado di bloccare il recettore GABA-A.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I trasportatori di membrana rappresentano importanti bersagli molecolari per lo sviluppo di farmaci utili per la terapia di numerose patologie.
- ▶ Numerose classi di farmaci, quali ad esempio i diuretici, i glicosidi cardioattivi e gli inibitori di pompa protonica, attraverso i loro effetti sui trasportatori di membrana hanno cambiato la storia clinica di molte patologie.
- ▶ Nuove conoscenze sulla struttura molecolare permetteranno di ottenere dei farmaci sempre più selettivi verso ciascuna isoforma e verso la modalità di funzionamento di molti trasportatori bidirezionali, esaltandone l'efficacia e riducendone la potenziale tossicità.

Bibliografia essenziale

- ▶ Annunziato L. Na^+/Ca^{2+} Exchanger (NCX). In: Offermanns S, Rosenthal W (eds). *Encyclopedia Molecular Pharmacology*. Berlin-Heidelberg: Springer, 2008.
- ▶ Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF. Pharmacology of brain Na^+/Ca^{2+} exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev* 2004;56:633-54.
- ▶ Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:215-36.
- ▶ Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev* 2004;282-95.
- ▶ Molinaro P, Cuomo O, Pignataro G et al. Targeted disruption of Na^+/Ca^{2+} exchanger 3 (NCX3) gene leads to a worsening of ischemic brain damage. *J Neurosci* 2008;28:1179-84.
- ▶ Pedersen SF, O'Donnell ME, Anderson SE, Cala PM. Physiology and pathophysiology of Na^+/H^+ exchange and $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransport in the heart, brain, and blood. *Am J Physiol* 2006;291:R1-R25.
- ▶ Sun D. The "Loop" Diuretic Drug Bumetanide-Sensitive $Na^+-K^+-Cl^-$ Cotransporter in Cerebral Ischemia. In: Annunziato L (ed). *New Strategies in Stroke Intervention*. Berlin-Heidelberg: Springer, 2010:85-108.

I neurotrasportatori

Gaetano Di Chiara

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire il significato funzionale generale dell'azione dei trasportatori dei neurotrasmettitori (neurotrasportatori)
- ▶ Conoscere la classificazione dei vari tipi di neurotrasportatori e il meccanismo molecolare del trasporto
- ▶ Comprendere il ruolo dei neurotrasportatori nel meccanismo d'azione di farmaci ad azione centrale e nelle malattie neurologiche e psichiatriche

I neurotrasportatori possono essere localizzati sulla membrana plasmatica e su quella delle vescicole sinaptiche e regolano la concentrazione dei neurotrasmettitori nei compartimenti del sistema nervoso centrale e periferico

Distinguiamo i trasportatori vescicolari da quelli della membrana plasmatica. I trasportatori vescicolari regolano la concentrazione di neurotrasmettitore tra l'interno delle vescicole sinaptiche e il citoplasma, dove sono localizzati gli enzimi che sintetizzano e quelli che degradano il trasmettitore stesso. In tal modo i trasportatori vescicolari regolano il turnover del trasmettitore e la dimensione dei quanti di trasmettitore liberati da ciascun potenziale d'azione o da una scarica (burst) di potenziali d'azione. I trasportatori della membrana plasmatica regolano invece la concentrazione di trasmettitore tra il compartimento extracellulare e quello intracellulare e quindi il grado di saturazione dei recettori di membrana da parte degli stessi trasmettitori. In tal modo i trasportatori della membrana plasmatica modulano sia la neurotrasmissione tonica che quella fasica.

Ruolo dei trasportatori nella funzionalità sinaptica

Dopo la liberazione del neurotrasmettitore, i processi fisiologici fondamentali che predispongono la terminazione nervosa al successivo evento sinaptico sono l'eliminazione del neurotrasmettitore dall'intervallo sinaptico, la ricostituzione delle vescicole sinaptiche e il ripristino del loro contenuto di neurotrasmettitore. Le molecole di neurotrasmettitore possono essere rimosse dalla sinapsi sia mediante degradazione enzimatica che

mediante trasporto all'interno della terminazione nervosa (ricaptazione o reuptake) o delle cellule gliali. Il trasporto è il meccanismo più diffuso; infatti, con l'eccezione dell'acetilcolina, tutti i neurotrasmettitori di basso peso molecolare, quali l'acido glutammico, la glicina, l'acido gamma-aminobutirrico (GABA), la serotonina e le catecolamine, sono trasportati come tali all'interno delle terminazioni nervose da neurotrasportatori ad alta affinità che sono specificamente localizzati nei neuroni dai quali il neurotrasmettitore è stato liberato (Figura 24.1A). Inoltre, i neurotrasportatori del GABA, dell'acido glutammico e della serotonina si trovano anche nella membrana plasmatica di alcune cellule gliali. L'acetilcolina liberata dalle terminazioni colinergiche invece di essere ricaptata è rapidamente idrolizzata dall'enzima acetilcolinesterasi in due prodotti inattivi: colina e acetato (vedi Capitoli 32 e 34). La colina è soggetta a un processo di ricaptazione a opera di un neurotrasportatore specifico localizzato nella membrana plasmatica delle terminazioni colinergiche ed è successivamente utilizzata per la sintesi di nuove molecole di acetilcolina (Figura 24.1A). Analogamente a quanto si osserva nelle terminazioni catecolaminergiche in seguito al blocco della ricaptazione, l'inibizione dell'acetilcolinesterasi delle sinapsi colinergiche determina un marcato incremento della durata degli effetti postsinaptici del neurotrasmettitore.

La ricaptazione è un processo di notevole efficacia: ad esempio, all'incirca il 50% delle molecole di neurotrasmettitore liberate sono trasportate all'interno delle terminazioni nervose presinaptiche. A conferma dell'importanza della ricaptazione, quando essa è bloccata da inibitori selettivi, gli effetti della stimolazione nervosa sull'organo effettore sono fortemente aumentati.

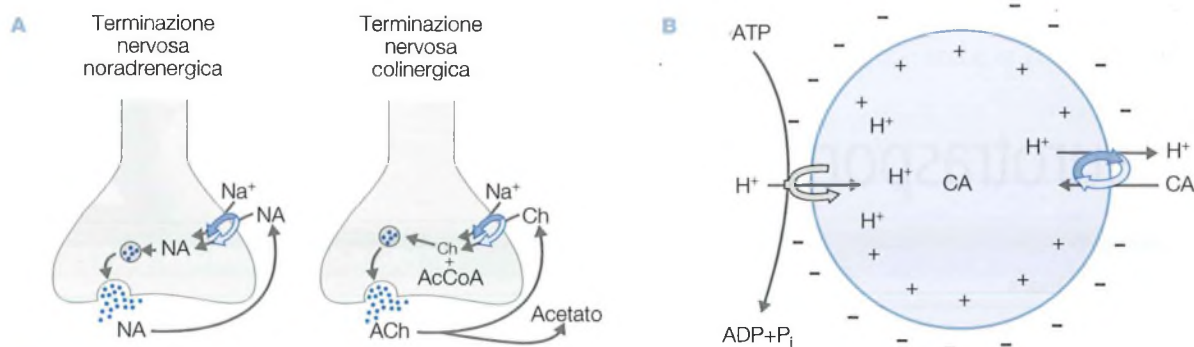


FIGURA 24.1 **A.** Rappresentazione schematica dei meccanismi di ricaptazione della noradrenalina (NA) e della colina (Ch). **B.** Rappresentazione schematica del meccanismo di trasporto delle catecolamine (CA) all'interno delle vescicole sinaptiche.

Una volta nel citoplasma, le molecole di neurotrasmettitore possono essere metabolizzate da enzimi intracellulari (quali le monoamminossidasi nel caso delle monoammine), oppure possono essere trasportate e accumulate nelle vescicole sinaptiche, pronte per un'ulteriore liberazione esocitotica quantale (Figura 24.1B). Le concentrazioni intravescicolari dei neurotrasmettitori possono essere dalle 10 alle 1000 volte superiori a quelle del citoplasma. Il trasporto è mediato da un trasportatore specifico delle vescicole che utilizza come energia per il trasporto il gradiente elettrochimico di ioni H⁺ generato da una pompa di protoni (ATPasi) localizzata nella membrana delle vescicole (Figura 24.1B). I valori di K_m dei vari substrati per il relativo neurotrasportatore sono corrispondenti alle loro concentrazioni citoplasmatiche. Infatti, la K_m del GABA e dell'acido glutammico per il relativo trasportatore vescicolare ha valori nell'ordine millimolare, mentre la K_m dei neurotrasportatori vescicolari per le catecolamine ha valori nell'ordine micromolare.

La traslocazione contro gradiente del neurotrasmettitore attraverso la membrana a opera del trasportatore avviene utilizzando l'energia del gradiente dell'Na⁺ creato dalla pompa Na⁺/K⁺ o del gradiente dell'H⁺ creato dalla pompa protonica attraverso la degradazione dell'ATP. In tal modo, il trasporto contro gradiente del trasmettitore è associato al cotrasporto secondo gradiente dell'Na⁺ o dell'H⁺.

Regolazione dell'attività e del traffico dei neurotrasportatori

Vista l'importanza dell'attività dei neurotrasportatori per la funzione sinaptica e dato il fondamentale carattere di flessibilità e adattabilità della neurotrasmissione chimica, non vi è da meravigliarsi che la funzione dei trasportatori, soprattutto della membrana plasmatica, possa essere regolata in maniera dinamica sotto l'influenza di vari stimoli allo scopo di adattarsi alle mutevoli esigenze della funzione sinaptica. Il trasportatore viene riciclato tra la membrana plasmatica e gli organuli intracellulari, dove viene sequestrato in forma non funzionale, con un tipo di traffico simile a quello che governa l'inserzione/rimozione dei recettori (vedi Capitolo 6); se rimane negli endosomi può essere riciclato e inserito nella membrana, se va nei lisosomi verrà degradato (Figura 24.2). Vari fattori (ad

esempio, concentrazione del substrato, farmaci, neurotrofine), alterando il turnover intracellulare del trasportatore e la sua compartimentalizzazione (trafficking), modificano l'inserzione del trasportatore nella membrana e quindi la sua attività funzionale. Ad esempio, l'amfetamina e la cocaina modificano in maniera opposta l'espressione del trasportatore della dopamina (DAT) sulla membrana delle terminazioni dopaminergiche (Figura 24.3). Il meccanismo attraverso il quale i vari stimoli modificano il traffico delle molecole di trasportatore tra la membrana e i vari compartimenti intracellulari appare coordinato e in parte sovrapposto a meccanismi di fosforilazione di proteine a opera della proteinchinasi C (PKC) che fanno parte di complessi sopramolecolari implicati nell'ancoraggio e nella fusione delle vescicole sinaptiche alla membrana presinaptica (syntaxina, complesso SNARE) (vedi Capitolo 32).

I neurotrasportatori per i neurotrasmettitori

I neurotrasportatori, sulla base della loro struttura molecolare, della loro distribuzione subcellulare e delle loro proprietà farmacologiche, sono distinguibili in tre principali famiglie (Figura 24.4): 1. trasportatori della membrana plasmatica Na⁺/K⁺-dipendenti, come quelli per l'acido glutammico e l'acido aspartico; 2. trasportatori della membrana plasmatica Na⁺/Cl⁻-dipendenti, come quelli per il GABA, la serotonina e le catecolamine; 3. trasportatori H⁺-dipendenti associati alle vescicole sinaptiche, che hanno come substrato le monoammine, l'acetilcolina e gli aminoacidi.

Trasportatori della membrana plasmatica Na⁺/K⁺-dipendenti per gli aminoacidi eccitatori

I neurotrasportatori per gli aminoacidi eccitatori sono trasportatori elettrogenici vettorialmente dipendenti dalle concentrazioni di Na⁺ extracellulare e di K⁺ intracellulare

L'energia necessaria per il funzionamento dei trasportatori dell'acido glutammico è fornita dal gradiente elettrochimico degli ioni Na⁺ e K⁺ a cavallo della membrana plasmatica.

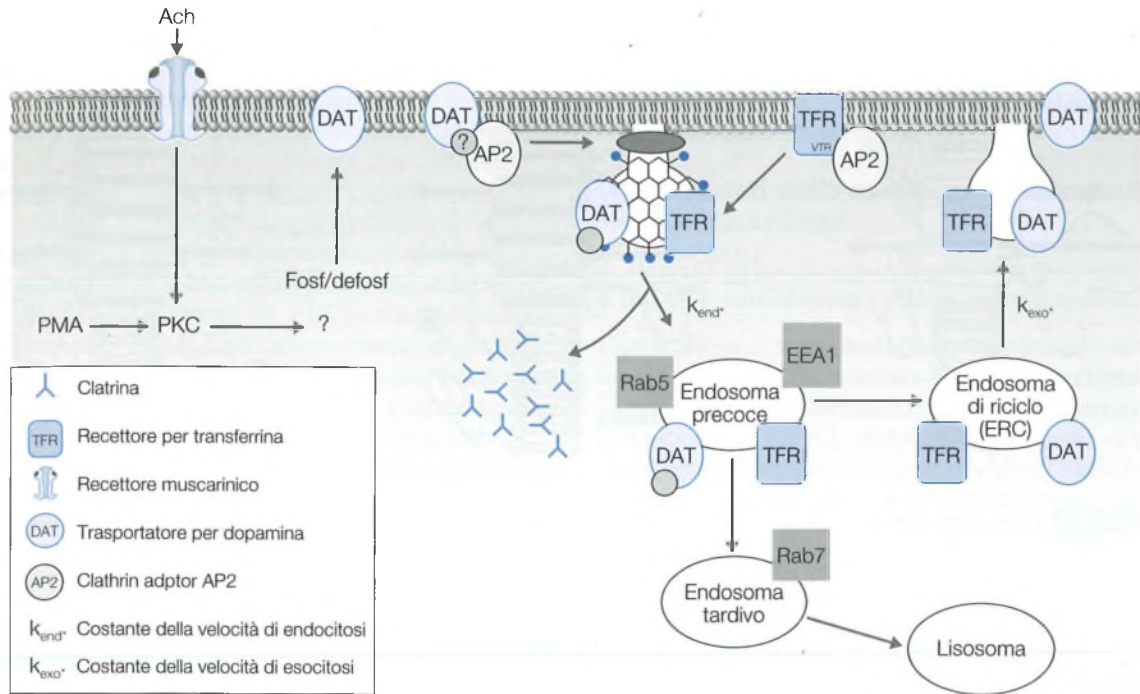


FIGURA 24.2 Modello di regolazione dell'endocitosi dei neurotrasportatori. L'attivazione della proteinchinasi C (esteri del forbolo o stimolazione dei recettori muscarinici) determina la fosforilazione del trasportatore (DAT) o di una proteina a esso collegata (AP2) con conseguente inserimento del DAT nel meccanismo endocitotico mediato dalla clatrina. Il DAT viene così internalizzato nel pool degli endosomi precoci e quindi avviato o al pool dei lisosomi per la sua degradazione o a quello degli endosomi di riciclo per il suo reinserimento nella membrana plasmatica. Rab5, Rab7, EEA1, TFR sono marcatori dei diversi pool endosomali.

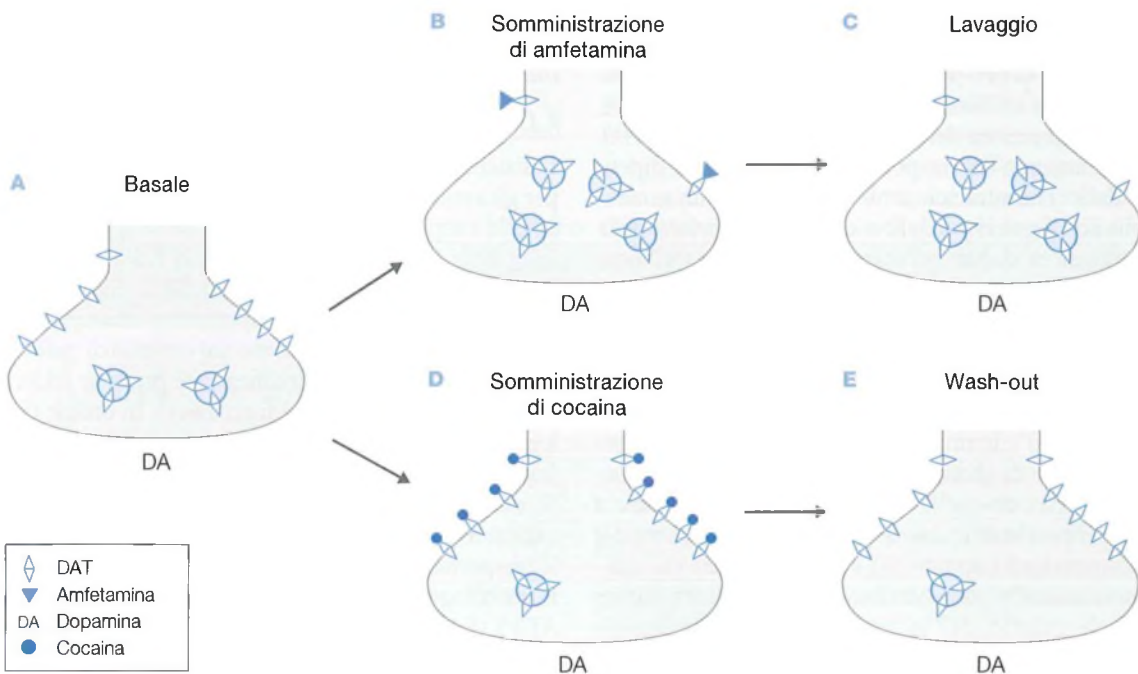


FIGURA 24.3 Regolazione dell'attività del trasportatore della dopamina (DAT) da parte dell'amfetamina e della cocaina. **A.** In condizioni basali il DAT è espresso sia sulla superficie esterna della membrana plasmatica che nelle membrane intracellulari. **B.** L'amfetamina compete con la dopamina per il trasportatore e riduce l'espressione del trasportatore sulla superficie esterna della membrana plasmatica. **C.** L'attività del trasportatore rimane ridotta per un certo tempo anche dopo la rimozione dell'amfetamina mantenendo elevate le concentrazioni extracellulari di dopamina. **D.** La cocaina blocca il DAT e ne aumenta l'espressione di membrana. **E.** Dopo la rimozione della cocaina l'attività del DAT aumenta, riducendo così le concentrazioni extracellulari di dopamina.

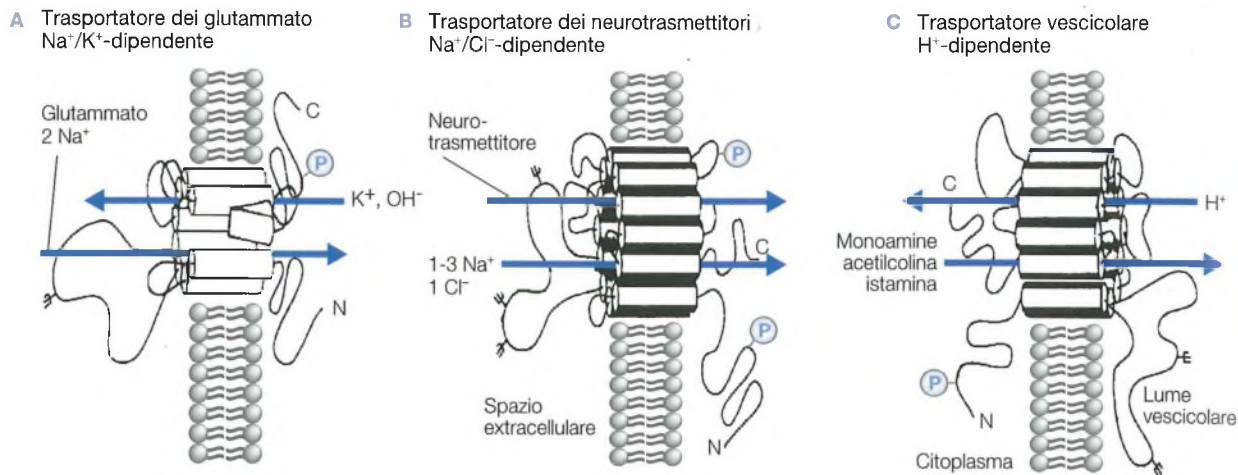


FIGURA 24.4 Diversità strutturale e dipendenza ionica dei neurotrasportatori. I neurotrasportatori ad alta affinità localizzati nella membrana plasmatica delle terminazioni nervose presinaptiche e delle cellule gliali rimuovono il neurotrasmettitore dallo spazio sinaptico, ne terminano l'azione sui recettori pre- e postsinaptici e regolano gli aspetti temporali della comunicazione neuronale. I trasportatori vescicolari regolano l'immagazzinamento del neurotrasmettitore nelle vescicole sinaptiche. Il trasporto del neurotrasmettitore sia a livello della membrana plasmatica che a livello della membrana vescicolare è direttamente accoppiato a gradienti ionici transmembranari che forniscono l'energia necessaria per il trasporto contro il gradiente di concentrazione. Sulla base della struttura molecolare, della distribuzione subcellulare e delle proprietà farmacologiche, i neurotrasportatori sono stati suddivisi in tre principali famiglie: trasportatori della superficie cellulare Na^+/K^+ -dipendenti (**A**); trasportatori della superficie cellulare Na^+/Cl^- -dipendenti (**B**); trasportatori H^+ -dipendenti delle vescicole sinaptiche (**C**).

Poiché la ricaptazione di una molecola di glutammato è abbinata al co-trasporto di due ioni Na^+ e al contro-trasporto di uno ione K^+ e di un anione OH^- o HCO_3^- , il sistema è elettrogenico. In ogni ciclo, l'anione contro-trasportato (OH^- oppure HCO_3^-) accetta un protone determinando una modificazione di pH: pertanto, la ricaptazione del glutammato evoca sia un flusso netto di cationi depolarizzante, che una diminuzione del pH intracellulare (Figura 24.4A). Il funzionamento del trasportatore è strettamente dipendente dalle concentrazioni ioniche. Nel caso di un aumento della concentrazione di K^+ o di una diminuzione della concentrazione di Na^+ nel compartimento extracellulare (quali si avverano, ad esempio, nel corso di prolungate stimolazioni ad alta frequenza delle terminazioni nervose o di ansia o di inibizione farmacologica della pompa Na^+/K^+ -ATPasi) il trasportatore può addirittura funzionare al contrario e contribuire in maniera sostanziale alla liberazione del glutammato dalle terminazioni nervose. La liberazione di glutammato attraverso il trasportatore è, a differenza di quella esocitotica, non vescicolare e calcio-indipendente e, date le proprietà eccitotossiche del glutammato (vedi Capitolo 35), è stato ipotizzato che questo meccanismo possa contribuire ad aggravare il danno neuronale indotto dall'ischemia. Tuttavia, l'inibizione della ricaptazione del glutammato prolunga le risposte mediate dai recettori per gli amminoacidi eccitatori di tipo NMDA e causa morte cellulare sia acuta che ritardata in modelli di degenerazione neuronale in vitro e in vivo. Queste osservazioni, mentre tendono a escludere che il reverse transport del glutammato giochi un ruolo nel meccanismo della degenerazione neuronale indotta da ipossia e riducono l'interesse degli inibitori del trasporto

degli amminoacidi eccitatori nella terapia dell'ischemia cerebrale, suggeriscono che la stimolazione del trasporto del glutammato possa avere un'applicazione terapeutica nelle malattie neurodegenerative (vedi CD: Approfondimento 24.1. *Prospettive terapeutiche della stimolazione del trasporto dell'acido glutammico*).

■ Organizzazione molecolare

L'esistenza di più di un sistema di trasporto cerebrale per gli amminoacidi eccitatori, quali l'acido glutammico e l'acido aspartico, era stata ipotizzata sin dagli anni 70 sulla base delle differenze regionali nella suscettibilità agli effetti inibitori di composti quali il diidrocainato e l'L- α -amino adipato. Questa ipotesi ha avuto piena conferma in seguito all'isolamento dal cervello di mammifero di diversi cDNA che codificano le proteine addette al trasporto degli amminoacidi eccitatori. In ordine cronologico, essi includono: 1) glutamate/aspartate transporter (ratto, rGLAST); 2) glutamate transporter (ratto, rGLT); 3) excitatory amino acid carrier (coniglio, cEAAC); 4) excitatory amino acid transporter 4 (uomo, hEAAT4). Il trasportatore hEAAT1 corrisponde molecolarmente e farmacologicamente a rGLAST, hEAAT2 a rGLT e hEAAT3 a rEAAC. Le denominazioni dei trasportatori degli amminoacidi eccitatori nelle diverse specie, nonché le relative proprietà strutturali, funzionali e farmacologiche sono riassunte nella tabella 24.1.

Tutti i trasportatori per gli amminoacidi eccitatori sinora isolati e caratterizzati presentano una topologia consistente in almeno sei segmenti idrofobici transmembranari (TM) con struttura ad α -elica, localizzati nel dominio

N-terminale del peptide. La presenza di almeno due siti di N-glicosilazione nell'ansa extracellulare localizzata tra TM3 e TM4 costituisce un'altra caratteristica condivisa dai diversi componenti di questa famiglia.

La distribuzione dei neurotrasportatori degli amminoacidi eccitatori è stata analizzata con metodiche di ibridizzazione in situ e di immunoistochimica (Tabella 24.1). GLAST è stato localizzato nell'astroglia dello strato delle cellule del Purkinje del cervelletto e di altre aree cerebrali, nonché in diversi organi periferici e nella placenta (Tabella 24.1). Analogamente, GLT ha una distribuzione uniforme nelle cellule gliali della neocorteccia, dell'ippocampo e della corteccia entorinale, con una espressione minore nella placenta. Al contrario, l'espressione di rEAAC sembra limitata alla regione somatodendritica dei neuroni della neocorteccia, dell'ippocampo e dei gangli della base. Questo neurotrasportatore non si trova nelle cellule della glia ma è espresso in diversi tessuti periferici quali placenta, cuore, fegato, rene, e intestino (Tabella 24.1). Sono stati clonati dalla corteccia motoria cinque omologhi del cDNA umano per il trasportatore del glutammato (EAAT1, 2, 3, 4 e 5). Sebbene siano state dimostrate differenze nella distribuzione cerebrale tra diverse specie, esiste una elevata omologia tra le sequenze amminoacidiche dei trasportatori umani EAAT1, EAAT2 ed EAAT3 e quelle dei trasportatori per gli amminoacidi eccitatori di ratto rGLAST, rGLT ed rEAAC, rispettivamente (Tabella 24.1). Il trasportatore codificato dal cDNA dell'EAAT4 umano è espresso prevalentemente nel cervelletto, dove è presente nelle spine dendritiche delle cellule di Purkinje; un ulteriore trasportatore, EAAT5, è stato identificato per ora solo nei neuroni della retina. In sistemi di espressione in vitro, il neurotrasportatore EAAT4 ha una elevata affinità per gli amminoacidi L-aspartato ed L-glutammato. Inoltre, il trasporto di questi

substrati è associato a una corrente di ioni Cl^- analoga a quella dei canali anionici operati da ligando. Sia la recaptazione dell'acido glutammico sia la corrente di ioni Cl^- potrebbero pertanto essere coinvolte nella regolazione della neurotrasmissione eccitatoria (Figura 24.4).

Trasportatori della membrana plasmatica Na^+/Cl^- -dipendenti

A questa categoria appartengono i trasportatori per il GABA, monoammine, glicina e altri amminoacidi

L'applicazione di tecniche di biologia molecolare all'analisi del trasporto dei neurotrasmettitori ha consentito l'identificazione e la caratterizzazione di un gran numero di trasportatori Na^+/Cl^- -dipendenti. Tra questi vi sono quelli per l'acido γ -aminobutirrico (GABA; Tabella 24.2 e vedi CD: Approfondimento 24.2. *Proprietà terapeutiche degli inibitori dei trasportatori del GABA*), per le monoammine (noradrenalina, serotonina e dopamina; Tabella 24.3), per la glicina, la taurina, la prolina, la betaina, la colina e numerosi altri trasportatori "orfani" per i quali non si è ancora identificato il substrato fisiologico.

Per tutti i membri di questa famiglia, l'affinità del trasportatore per il neurotrasmettitore è positivamente modulata dalla concentrazione locale di ioni Na^+ e Cl^- . Essi sono sinporti (NSS, *Neurotransmitter-Sodium Symporter*) che utilizzano l'energia del gradiente per l' Na^+ prodotto dall'attività della Na^+/K^+ -ATP-asi per la traslocazione del substrato attraverso la membrana. L'efficienza del trasporto è notevole e può giungere a creare gradienti di concentrazione transmembrana del neurotrasmettitore da 700 a 1800 volte. La dipendenza ionica del trasporto fa sì che, in particolari condizioni, questi trasportatori possano estrudere il neurotrasmettitore dal citoplasma e versarlo nello spazio extracellulare.

TABELLA 24.1 Neurotrasmettitori della membrana plasmatica: trasportatori degli amminoacidi eccitatori Na^+/K^+ -dipendenti

Specie			Localizzazione (neuroni vs. glia)	Distribuzione nel SNC e nei tessuti periferici	Substrato*	Inibitore*
Coniglio-Topo	Ratto	Uomo				
mGLAST	rGLAST 543 aa 60 kDa	hEAAT1 Omologia vs rGLAST: 97%	Glia (astrociti)	Corteccia frontale, ippocampo, gangli della base, corteccia del cervelletto (astrociti), retina (cellule di Müller). Cuore, polmone, placenta, muscolo striato	L-Glutammato L-Aspartato THA, TacOA, TpnOA	TBzOA T1NpOA T2NpOA
mGLT	rGLT 573 aa 60 kDa	hEAAT2 Omologia vs rGLT: 90%, vs hGLAST: 68%	Glia (astrociti)	Corteccia frontale, ippocampo, n. settale lat., gangli della base, corteccia del cervelletto. Placenta (espressione bassa)	L-Glutammato L-Aspartato THA	Acido cainico Acido diidrocaïnico TBzOA
mEAAC cEAAC 524 aa 57 kDa	rEAAC Omologia vs rGLAST: 66%, vs rGLT: 61%	hEAAT3 Omologia vs rEAAC: 95%, vs cEAAC: 95%	Neuroni	Corteccia frontale, ippocampo, gangli della base, cervelletto. Placenta, cuore, fegato, rene, intestino tenue	L-Glutammato L-Aspartato THA	—
—	—	hEAAT4 Omologia vs hEAAT1-3: 65%, 41% e 48%	Neuroni	Cervelletto (espressione elevata), mesencefalo, corteccia cerebrale, ippocampo (espressione bassa). Placenta	L-Glutammato L-Aspartato THA	—

THA: treo- β -idrossi-aspartato; TacOA: treo- β -acetossi-aspartato; TpnOA: treo- β -propionilossi-aspartato; TbzOA: treo- β -benzilossi-aspartato; T1NpOA: treo- β -(1-naftil) ossi-aspartato; T2NpOA: treo- β -(2-naftil) ossi-aspartato

* Per ulteriori informazioni relative ad alcuni nuovi substrati/inibitori e bloccanti dei trasportatori degli amminoacidi eccitatori, vedi CD: Approfondimento 24.1

I trasportatori per le monoammine (serotonina, noradrenalina e dopamina) costituiscono una sottofamiglia caratterizzata da considerevole omologia della sequenza aminoacidica (69-80%) e dal fatto di essere il bersaglio di farmaci quali gli antidepressivi (triciclici ed eterociclici), l'amfetamina, la cocaina e i loro congeneri.

L'applicazione di un modello evolutivistico ai dati disponibili sulla struttura dei trasportatori appartenenti a questa famiglia in varie specie ha generato un albero genealogico (Figura 24.5) dal quale risultano due grandi sottofamiglie: quella dei trasportatori per le ammine (5-HT, DA, NA), e quella dei trasportatori per il GABA, la taurina, la creatina e la betaina.

L'analisi della composizione aminoacidica prevede la presenza di 12 segmenti transmembrana.

L'analisi della composizione aminoacidica consente di proporre un modello strutturale comune per questi trasportatori, caratterizzato dalla presenza di 12 segmenti transmembrana, intercalati da cinque anse intracellulari e sei extracellulari (Figura 24.6). Le estremità amminica e carbossilica sono entrambe intracellulari. La lunga ansa (loop) extracellulare localizzata tra il III e il IV segmento

transmembrario contiene numerosi potenziali siti di glicosilazione (Figura 24.6). Questa ansa costituisce il motivo più variabile tra i membri della famiglia e potrebbe pertanto conferire al trasportatore la specificità (in termini di V_{max}) nei confronti dei vari substrati.

Meccanismo molecolare di funzionamento dei trasportatori

Il modello classico del funzionamento molecolare degli NSS ipotizza che possano assumere due stati conformazionali nei quali il sito di legame per il neurotrasmettitore è rivolto alternativamente verso l'esterno e verso l'interno della membrana plasmatica. In condizioni di normale funzionamento (potenziale transmembrana di riposo, Na^+ e Cl^- abbondanti nello spazio extracellulare), il trasportatore lega il neurotrasmettitore e gli ioni mentre è rivolto verso l'esterno della membrana cellulare. Il legame induce una modificazione conformazionale del trasportatore che determina l'esposizione dei siti di legame del neurotrasmettitore verso l'interno della cellula. Sul versante intracellulare della membrana, dove le concentrazioni di Na^+ e di Cl^- sono basse, gli ioni si staccano e causano

TABELLA 24.2 Famiglia dei neurotrasportatori della membrana plasmatica Na^+/Cl^- -dipendenti. Trasportatori del GABA

Topo	Specie		Localizzazione (neuroni vs. glia)	Distribuzione nel SNC e nei tessuti periferici	Substrato*	Inibitore*
	Ratto	Uomo				
rGAT1	mGAT1	hGAT1	N >> G	Bulbo olfattorio, ippocampo, corteccia cerebrale, talamo, ipotalamo, subtalamo, corpo striato, substantia nigra, corteccia cerebellare, tronco encefalico, midollo spinale	GABA > Betaina	Ac. nipecotico = L-DABA >> β -alanina
rGAT2 602 aa	mGAT3	?	-	Pia madre, aracnoide	GABA > Betaina	β -alanina > L-DABA = Ac. nipecotico
rGAT3 627 aa	mGAT4	hGAT3	G > N	Neuroni: bulbo olfattorio, retina Glia: corteccia cerebrale, ippocampo, tronco encefalico, nuclei del tetto del quarto ventricolo	GABA > Betaina	β -alanina > L-DABA = Ac. nipecotico
rBGT	mGAT2	hBGT	N >> G	Pia madre, aracnoide, cellule granulari del cervelletto, cellule epiteliali dei tubuli renali	Betaina > GABA	β -alanina >> Ac. nipecotico = L-DABA

* Per ulteriori informazioni relative ad alcuni nuovi substrati/inibitori e bloccanti dei trasportatori del GABA vedi Box 2.

TABELLA 24.3 Famiglia dei neurotrasportatori della membrana plasmatica Na^+/Cl^- -dipendenti. Trasportatori delle monoammine

	cDNA (specie)	Struttura molecolare	Localizzazione	Substrato	Inibitori
1) Trasportatore della NE (NET)	Topo Ratto Uomo	≈ 600 aa 12 TM	Neuronale	Affinità: DA > NE V_{max} : NE > DA Amfetamina	Antidepressivi triciclici ed eterociclici <i>Inibitori selettivi (antidepressivi):</i> Maprotilina, viloxazina, reboxetina Cocaina, metilfenidato. D-amfetamina = L-amfetamina
2) Trasportatore della DA (DAT)	Topo Ratto Uomo	≈ 600 aa 12 TM	Neuronale / Piastrine	NE - DA Amfetamina, MDMA	<i>Inibitore selettivo (antidepressivo):</i> Amineptina GBR - 12935 Cocaina D-amfetamina > L-amfetamina
3) Trasportatore della 5-HT (SERT)	Topo Ratto Uomo	≈ 600 aa 12 TM	Neuronale / Gliale Piastrine / linfociti (vedi testo)	5-HT MDMA, fenfluramina MPTP	SSRI: fluoxetina, paroxetina, citalopram, sertralina

NE: noradrenalina; DA: dopamina.

così una drastica riduzione dell'affinità del trasportatore per il neurotrasmettitore e il suo rilascio all'interno della cellula. Questo modello classico è stato perfezionato e modificato dalla delucidazione da parte di Yamashita e collaboratori (2005), attraverso la diffrazione a raggi X ad alta risoluzione (1,65 Å), della struttura cristallina del trasportatore per la leucina (LeuT), estratto da un batterio e appartenente alla stessa famiglia (SLC6) dei trasportatori delle monoammine e del GABA. Il substrato e gli ioni sodio co-trasportati sono localizzati all'interno del trasportatore, in corrispondenza di una tasca che corrisponde ai tratti deconvoluti dei due segmenti transmembranari TM1 e TM6. In questa conformazione del trasportatore, il substrato, l'amminoacido leucina, è legato attraverso legami

ionici con il suo gruppo carbossilico (COO⁻) a uno dei due ioni Na⁺ co-trasportati. Nel caso di substrati aminici (dopamina, 5-HT, noradrenalina) l'Na⁺ si lega a un residuo carbossilico di aspartato. Il substrato è mantenuto nella tasca da legami ionici con i residui amminoacidici che contornano la tasca (Figura 24.7). Questa conformazione corrisponde a uno stato occluso, nel quale la traslocazione del substrato è impedita da due saracinesche molecolari (gates), una rivolta verso l'esterno e l'altra verso l'interno, costituite da coppie ioniche di residui amminoacidici forniti dai segmenti che contornano la tasca. Nel caso del LeuT il substrato è trasportato assieme all'Na⁺ ma non assieme al Cl⁻ e in questo caso il Cl⁻ non si lega nella tasca del substrato. Nel caso del trasportatore del GABA, che è co-trasportato con l'Na⁺ e il Cl⁻, quest'ultimo ione si lega nella tasca assieme al substrato.

Lo studio di Yamashita e collaboratori (2005) ha fornito il modello per ricostruire, attraverso dati indiretti di relazione struttura-attività e di bioenergetica, il meccanismo molecolare del funzionamento di altri trasportatori appartenenti alla stessa famiglia, come ad esempio il DAT, il cui meccanismo è illustrato nella figura 24.8. Questo modello prevede che il trasporto del substrato, la dopamina (DA), comporti il passaggio del trasportatore

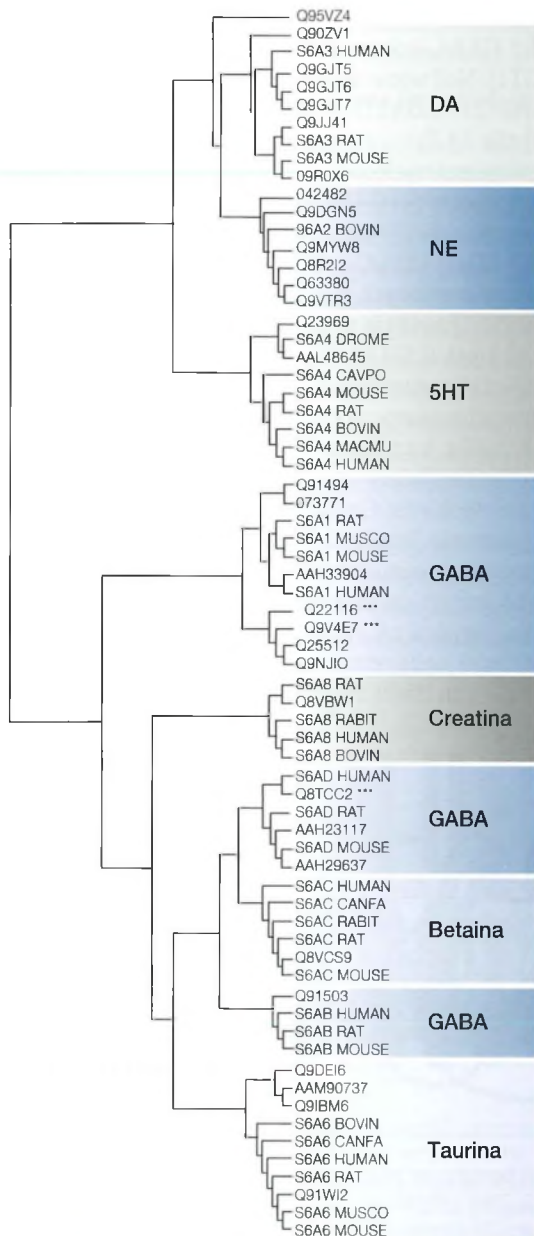


FIGURA 24.5 Albero genealogico dei neurotrasportatori Na⁺/Cl⁻-dipendenti.

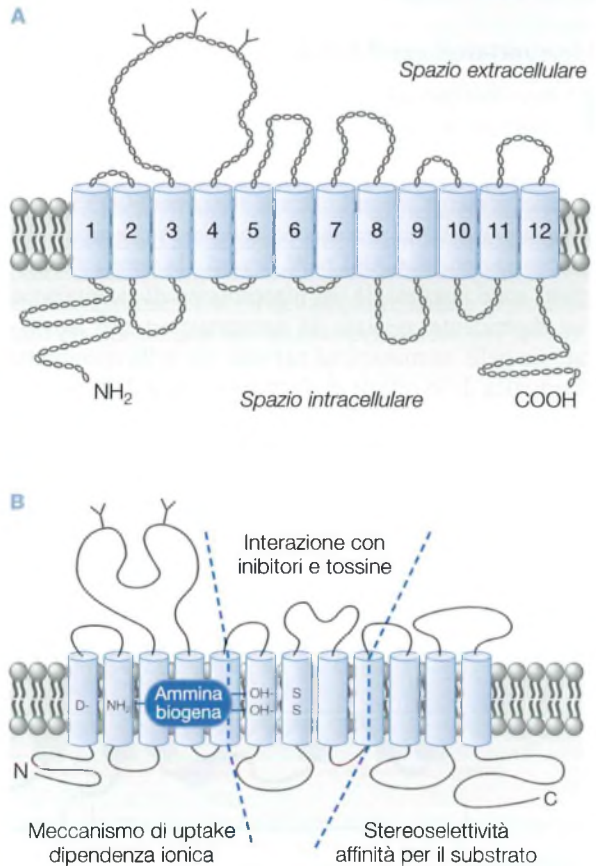


FIGURA 24.6 Topologia dei neurotrasportatori Na⁺/Cl⁻-dipendenti. **A.** Trasportatori per il GABA. **B.** Trasportatori per le monoammine. Per il loro funzionamento molecolare vedi figure 24.7 e 24.8.

attraverso 4 stati conformazionali e due siti di legame del substrato, S1 ed S2. Secondo questo modello, la conformazione occlusa è il risultato dell'entrata del substrato all'interno del trasportatore, che, in condizioni di riposo, è nella conformazione orientata verso l'esterno e quindi con il gate interno chiuso e quello esterno aperto. Successivamente, il legame di una seconda molecola di substrato induce l'apertura del gate interno e il passaggio dalla conformazione occlusa a quella aperta verso l'interno, che permette il passaggio del substrato all'interno della cellula (Figura 24.8).

Questo modello può essere utilizzato per spiegare il meccanismo di inibizione del DAT da parte di farmaci come la cocaina. La cocaina si lega inizialmente al sito S2. Se questo legame al DAT avviene nella conformazione orientata verso l'esterno, la cocaina impedisce l'accesso della DA al sito S1; se invece avviene nella conformazione occlusa, il farmaco impedisce la transizione del DAT dalla conformazione occlusa a quella aperta verso l'interno, e quindi il passaggio della DA all'interno della cellula. La cocaina, una volta legata al sito S2, può, in seguito alle modificazioni conformazionali da essa indotta, farsi strada all'interno del trasportatore e legarsi anche al sito primario del substrato (S1). Questo modello è compatibile con l'esistenza di vari siti di legame della cocaina al DAT, di natura sia competitiva che non-competitiva con la DA.

I trasportatori per il GABA

I neurotrasportatori per il GABA possono essere localizzati sia sui neuroni che sulla glia

Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio cerebrale, presente secondo alcune stime nel 60-75% delle sinapsi del sistema nervoso centrale dei mammiferi. La concentrazione di GABA nelle sinapsi e la durata dei suoi effetti sono regolate da un meccanismo di ricaptazione Na^+ -dipendente mediato da neurotrasportatori localizzati sia nelle terminazioni nervose sia nella membrana plasmatica delle cellule gliali in prossimità della fessura

sinaptica (Tabella 24.2). In base alla loro sensibilità agli effetti di inibitori selettivi, i sistemi di trasporto del GABA sono stati tradizionalmente classificati in due tipi: neuronale e gliale. Il trasporto neuronale del GABA è inibito selettivamente dall'acido nipecotico e dall'acido L-2,4-diaminobutirrico (L-DABA), mentre il trasporto gliale è selettivamente inibito dalla β -alanina (Tabella 24.2). Tuttavia sono state rilevate alcune importanti eccezioni nella selettività degli inibitori: ad esempio, il trasportatore del GABA localizzato negli oligodendrociti e nelle cellule gliali di Müller della retina non è inibito dalla β -alanina.

Struttura molecolare

Quattro diversi trasportatori del GABA sono stati clonati nel topo (mouse GABA transporters, mGAT1, 2, 3 e 4) e tre nel ratto (rGAT1, 2 e 3). Il trasportatore mGAT2 probabilmente corrisponde al trasportatore della betaina e del GABA isolato originariamente dal rene del cane (BGT1). Nell'uomo sono stati sinora clonati gli omologhi di rGAT1 (hGAT1), rGAT3 (hGAT3) e rBGT (hBGT) (Tabella 24.2).

La sequenza nucleotidica del cDNA per l'rGAT1, il primo trasportatore del GABA a essere clonato, codifica una glicoproteina di 599 amminoacidi con un peso molecolare di 67 kDa. I cDNA dell'rGAT2 e dell'rGAT3 codificano invece due proteine di rispettivamente 602 e 627 amminoacidi. Questi tre neurotrasportatori hanno un'elevata affinità per il GABA ($K_m \approx 10 \mu\text{M}$) e una struttura secondaria caratterizzata dalla presenza di 12 potenziali segmenti transmembranari con le estremità amminiche e carbossiliche localizzate nel citoplasma (Figura 24.6A). Le anse intracellulari contengono siti di fosforilazione per la proteinchinasi Ca^{2+} /calmodulina-dipendente. Inoltre, nel dominio localizzato immediatamente a monte del segmento transmembranario TM9, i trasportatori del GABA hanno un insieme di residui amminoacidici con carica elettrica. mGAT1 e l'omologo del ratto rGAT1 sono distribuiti nella retina, in tutto il cervello e nel midollo spinale, con livelli di espressione particolarmente elevati

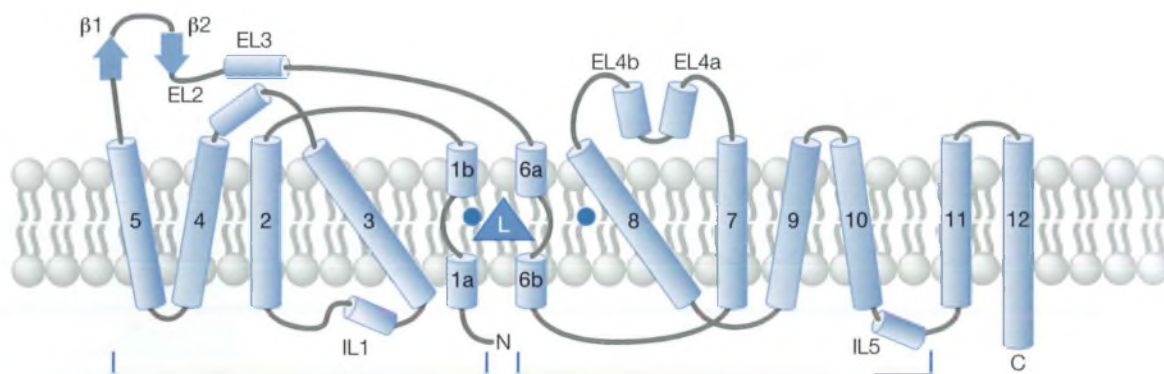


FIGURA 24.7 Topologia del trasportatore della leucina appartenente alla famiglia dei trasportatori delle monoammine. I domini transmembranari (TM) sono numerati da 1 a 12. I domini da TM1 a TM5 e da TM6 a TM10 costituiscono due gruppi distinti ma omologhi e orientati in senso opposto nella membrana. Questi due gruppi di domini TM formano le pareti di un pseudo-canale attraverso cui vengono traslocati il substrato e gli ioni co-trasportati. TM1 e TM6 perdono la struttura a elica a metà membrana così da formare la tasca dove si legano i due ioni Na^+ (pallini blu) e il substrato (triangolo blu L). (Da: Yamashita et al., 2005, modificata)

EL: loops esterni; IL: loops interni; $\beta 1$ e $\beta 2$ corrispondono a porzioni con struttura β .

nel bulbo olfattorio, nella neocorteccia, nell'ippocampo e nella corteccia del cervelletto. L'espressione di GAT1 è preponderante nei neuroni GABAergici; tuttavia questo trasportatore è presente anche in sede postsinaptica di neuroni glutamatergici (dendriti dei neuroni piramidali) e negli astrociti della corteccia cerebrale di ratto. rGAT3 (omologo dell'mGAT4) è particolarmente abbondante nella retina, nel bulbo olfattorio, nell'ipotalamo, nel talamo mediale e nel tronco dell'encefalo, mentre l'espressione è molto bassa nella neocorteccia, nel cervelletto e nell'ippocampo. Contrariamente a GAT1 che è di natura prevalentemente neuronale, rGAT3 è prevalentemente (ma non esclusivamente) gliale. rGAT2 (l'omologo di mGAT3) è localizzato esclusivamente nelle cellule della pia madre e dell'aracnoide. Infine, l'mRNA codificante il trasportatore per betaina e GABA del topo (mGAT2, l'omologo dell'hBGT dell'uomo) è localizzato nell'epitelio dei tubuli renali e nelle leptomeningi.

■ Ruolo fisiopatologico e modulazione farmacologica

I neurotrasportatori del GABA sono localizzati sia nelle terminazioni nervose GABAergiche sia nelle cellule gliali e nelle membrane postsinaptiche di neuroni non GABAergici. Gli inibitori della ricaptazione del GABA hanno un evidente potenziale terapeutico come agenti antiepilettici. Ad esempio, la tiagabina, un inibitore della ricaptazione del GABA con affinità preferenziale per il trasportatore rGAT1, possiede capacità anticonvulsivante in diversi modelli sperimentali di epilessia; l'eccesso di GABA extracellulare prodotto dalla tiagabina indurrebbe l'attivazione di recettori inibitori GABA-B localizzati nelle terminazioni nervose glutamatergiche con conseguente riduzione del rilascio di glutammato.

Sia i trasportatori neuronali che quelli gliali possono essere coinvolti nell'estrusione (Ca^{2+} -indipendente e non esocitotica) del GABA che si osserva quando la concentrazione extracellulare di K^+ aumenta a dismisura durante

l'attività convulsivante. Tale liberazione non esocitotica del GABA costituisce un importante meccanismo limitante della diffusione dell'attività epilettica dal focus ad altre aree dell'encefalo e le sue disfunzioni potrebbero contribuire alla patogenesi di alcune forme di epilessia. È stato infatti osservato che la densità dei neurotrasportatori neuronali del GABA è diminuita nell'ippocampo di pazienti affetti da epilessia del lobo temporale. Inoltre, in questi pazienti l'incremento della concentrazione extracellulare di GABA provocato dalla somministrazione di concentrazioni depolarizzanti di KCl attraverso una sonda da microdialisi cerebrale è significativamente più basso nel focus epilettico (vedi CD: Approfondimento 24.2)

Il trasportatore per la serotonina

Il neurotrasportatore per la serotonina (SERT) svolge un ruolo critico per la terminazione della neurotrasmissione serotoninergica ed è il bersaglio farmacologico di taluni farmaci antidepressivi e di numerosi agenti neurotossici. Per questo motivo è vivo l'interesse della ricerca sui fattori ambientali, patologici e farmacologici che possono interferire sul suo funzionamento e sulle conseguenze che tali alterazioni funzionali hanno sullo sviluppo cerebrale, sui fenomeni di plasticità sinaptica e sui processi neurodegenerativi.

■ Struttura molecolare

Il cDNA di SERT umano e di ratto codifica per una proteina con 12 domini transmembranari (Figura 24.6B). Studi di mutagenesi e delezione indicano che un residuo di aspartato e probabilmente un insieme di residui di serina, rispettivamente localizzati nei domini transmembranari TM1 e TM6, sono coinvolti nella traslocazione del substrato e nel legame competitivo degli inibitori. Studi di autoradiografia con ligandi selettivi, quali la [3H]cianoimipramina e il [3H]citalopram, hanno dimostrato una elevata densità del neurotrasportatore per la 5-HT

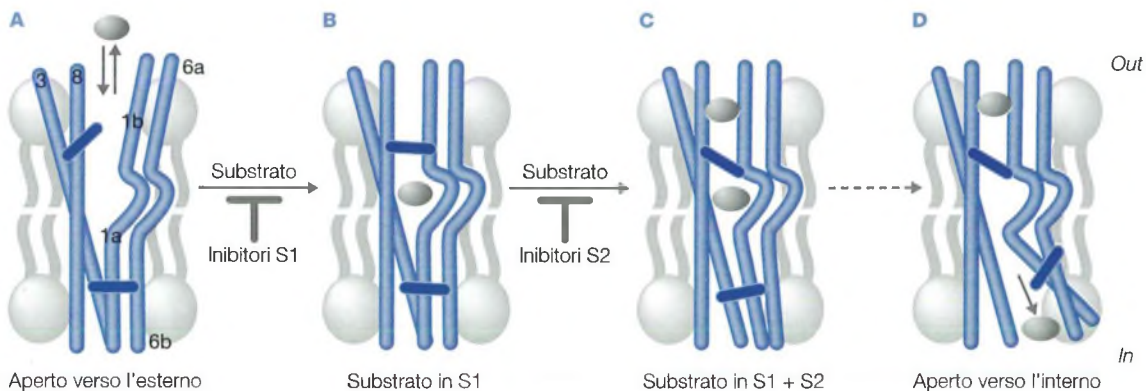


FIGURA 24.8 Modello del ciclo di traslocazione del substrato nel DAT. Il trasportatore ha due siti di legame del substrato (dopamina-ovolo). **A.** Nella conformazione aperta verso l'esterno, le TM 1a e 6b assumono una conformazione stretta mentre le TM 1b e 6a una conformazione aperta in modo che il substrato si possa legare. **B.** Il legame del substrato a livello del sito S1 promuove il passaggio alla conformazione semi-occlusa delle TM 1b e 6a. **C.** Il legame di una seconda molecola di substrato al secondo sito (S2) del trasportatore promuove **(D)** l'apertura del cancello interno, il passaggio alla conformazione aperta verso l'interno e il conseguente distacco del substrato dal sito di legame e il suo passaggio all'interno della cellula. Gli inibitori del trasporto, come la cocaina, possono agire legandosi al sito S1, impedendo il legame del substrato oggetto di trasporto, o a quello S2, impedendo l'apertura del gate interno e la traslocazione del substrato legato al sito S1. (Da: Shan et al., 2011, modificata)

nei corpi cellulari serotonergici dei nuclei del rafe e nelle loro aree di proiezione, quali la neocorteccia, la corteccia entorinale, la regione CA3 dell'ippocampo, l'amigdala, la substantia nigra, il nucleo caudato-putamen e l'ipotalamo.

Numerosi meccanismi di trasduzione del segnale sono in grado di influenzare la trascrizione del gene per il SERT (Figura 24.9). La sua espressione è regolata dall'AMP ciclico, dalla proteinchinasi C e da meccanismi tirosina chinasi-dipendenti. Anche l'attività della proteina SERT è finemente regolata, ad esempio da nitrossido e GMP ciclico, nonché da modificazioni post-traslazionali, tra le quali la fosforilazione/defosforilazione a opera di una proteinchinasi C e di una proteinchinasi A calmodulina-dipendente.

Il gene del SERT umano, localizzato nel locus 17q11.2 del cromosoma 17, è composto da 14 esoni distribuiti lungo circa 35 kb (Figura 24.9). La mappatura funzionale del promotore ha rivelato numerosi elementi di regolazione negativi e alcuni elementi regolatori positivi. In particolare, le sequenze chiave del promotore sono localizzate a non più di 100 bp a monte (ad esempio, in direzione 5') dal sito di inizio della trascrizione; l'induzione dell'attività del promotore causata dall'AMP ciclico e dalla proteinchinasi C dipende da elementi in cis e che corrispondono a potenziali siti di legame per diversi fattori di trascrizione (ad esempio: siti AP1, AP2, SP1 e un singolo elemento del tipo CRE) (Figura 24.9).

Alterazioni della ricaptazione della serotonina sono state osservate nelle piastrine e nel cervello di pazienti affetti da disturbi dell'umore. Studi sulle possibili mutazioni delle sequenze geniche promotrici e codificanti suggeriscono che, nella maggior parte dei casi, i difetti funzionali risultano da alterazione della regolazione dell'espressione. In particolare è stata identificata una regione a elevato polimorfismo (*5-HT Transporter Gene Linked Polymorphic Region*, 5-HTTLPR) (Figura 24.9) che sembra avere un ruolo importante nella regolazione dell'espressione del trasportatore. Recenti studi hanno dimostrato una elevata variabilità allele-dipendente nella derepressione dell'attività del promotore di questo gene da parte dei glucocorticoidi e una significativa associazione tra l'allele S del promotore (variante corta del 5-HTTLPR) e personalità ansiosa. Infatti, in un campione relativamente ampio di soggetti è stato dimostrato che l'allele S è associato sia a una minore espressione del SERT nei linfociti che a una aumentata incidenza di comportamenti caratteristici della personalità nevrotica.

SERT come bersaglio molecolare di farmaci antidepressivi

SERT dei terminali nervosi è un importante bersaglio molecolare sia di farmaci antidepressivi sia di alcune neurotossine e farmaci d'abuso (vedi CD: Approfondimento 24.3. *Gli inibitori dei neurotrasportatori delle ammine e i farmaci antidepressivi*). Gli antidepressivi triciclici, come l'imipramina, e gli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, quali la fluoxetina, la paroxetina, il citalopram e la sertralina, occupano siti farmacologica-

mente distinti dal sito di legame per il substrato. Alcune neurotossine tra cui i derivati dell'amfetamina come la 3, 4-metilendioossimetamfetamina (MDMA, "ecstasy"), la fenfluramina, l'1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e la 2'-NH₂-MPTP vengono concentrate nei neuroni serotonergici da parte di questo neurotrasportatore (Tabella 24.3).

Mentre gli antidepressivi tri- ed eterociclici inibiscono la ricaptazione delle monoammine, numerosi agenti aumentano la trasmissione monoaminergica facilitando il rilascio non-esocitotico del neurotrasmettore conseguentemente all'inversione della direzione di trasporto del substrato (invece di ricaptarlo, il trasportatore estrude il neurotrasmettore). Tra questi ultimi sono le amfetamine e i loro analoghi come l'MDMA, i quali sono substrati sia del SERT che del trasportatore della dopamina (DAT). Le amfetamine sono substrato del trasportatore e come tali vengono trasportate all'interno della terminazione. Ciò produce un aumento dei siti disponibili per la serotonina sulla superficie interna della membrana e conseguentemente un aumento del trasporto verso l'esterno del neurotrasmettore. In queste condizioni, la serotonina può essere liberata per un meccanismo non-esocitotico attraverso un'inversione della direzione del trasporto del substrato da parte del trasportatore (Figura 24.10). Questo meccanismo è utilizzato dall'MDMA e dalla fenfluramina (un composto anoressizzante) per liberare la serotonina, la quale è poi trasformata in composti reattivi (ad esempio, 5,7 di-idrossitriptamina), che provocano processi neurodegenerativi a carico dei terminali serotonergici. In accordo con il ruolo del trasportatore nella liberazione di serotonina provocata dall'MDMA con conseguente neurotossicità, gli effetti tossici sono prevenuti dai composti tri- ed eterociclici che inibiscono la ricaptazione della serotonina. Analogamente, la liberazione di serotonina provocata dalla somministrazione della fenfluramina è bloccata dagli inibitori del SERT (clomipramina e fluoxetina). A conferma del ruolo centrale del SERT in alcuni effetti comportamentali dell'MDMA, studi recenti in topi in cui il gene codificante

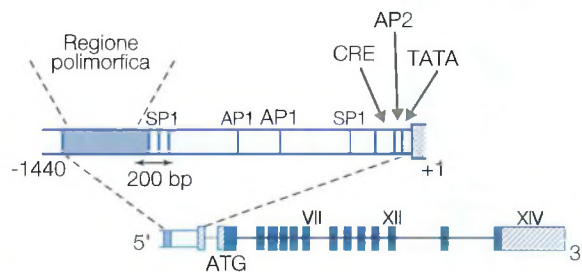


FIGURA 24.9 Struttura del gene umano per il trasportatore della serotonina (SERT) e della sua regione regolatoria 5', nel locus 17q11.2 del cromosoma 17. I box blu indicano le regioni tradotte e i box a strisce indicano le regioni non tradotte. Il promotore del gene per il SERT contiene un motivo TATA e numerosi potenziali siti di legame per i fattori di trascrizione AP1, AP2, SP1 e CRE localizzati nell'estensione terminale 5'. È indicata la posizione della regione polimorfica (5-HTTLPR) del gene per SERT. ATG: sito di inizio della traduzione.

questo trasportatore era stato inattivato mediante ricombinazione omologa hanno dimostrato che l'iperattività motoria indotta dall'MDMA in animali di controllo non si osserva nei mutanti privi di trasportatore.

Il trasportatore per la dopamina

Successivamente alla liberazione esocitotica dalle terminazioni nervose, anche l'azione della dopamina sui suoi recettori è terminata dalla ricaptazione neuronale a opera di un trasportatore Na^+/Cl^- -dipendente (Tabella 24.3). Sebbene sia associato prevalentemente ai neuroni dopaminergici, il trasportatore della dopamina (DAT) è anche espresso nelle piastrine e in numerose linee di cellule tumorali come quelle di neuroblastoma. Dopo la ricaptazione, la dopamina può essere trasportata all'interno delle vescicole sinaptiche oppure metabolizzata a opera delle monoamminossidasi (MAO) associate ai mitocondri (Figura 24.10).

Struttura molecolare

Il DAT è una glicoproteina di circa 80 kDa con molteplici varianti localizzate in diverse aree cerebrali e caratterizzate da distinte catene laterali di carboidrati. Il cDNA di DAT umano codifica una proteina di 620 amminoacidi con una sequenza a elevata omologia con quella di altri membri della stessa famiglia di trasportatori, come quelli per la serotonina, la norepinefrina e il GABA. Anche la sequenza amminoacidica di DAT presenta 12 potenziali territori idrofobici transmembranari con i terminali aminico e carbossilico localizzati nel citoplasma, mol-

teplici siti di glicosilazione nei tratti extracellulari e di fosforilazione nelle anse intracellulari. È stato dimostrato recentemente che i siti di glicosilazione del DAT subiscono notevoli variazioni durante lo sviluppo prenatale e durante l'invecchiamento. Un residuo di acido aspartico localizzato nel primo segmento transmembranario è importante per l'efficienza del trasporto e per la dipendenza ionica, mentre un insieme di residui di serina nei segmenti transmembranari TM6, TM7 e TM8 determina l'affinità per gli inibitori. Infine, il dominio del terminale carbossilico determina la stereoselettività e l'affinità per i rispettivi substrati. I gruppi solfidrilici dei residui di cisteina localizzati nella seconda ansa extracellulare del DAT sono necessari per un adeguato funzionamento del trasportatore in quanto svolgono un ruolo importante nell'inserzione della proteina nella membrana plasmatica e nella formazione di strutture quaternarie. La proteina DAT contiene inoltre una potenziale "chiusura lampo" molecolare di leucina (leucine zipper) che potrebbe determinare la formazione di omotetrameri.

Farmacologia del DAT

La cocaina inibisce l'attività di DAT. L'azione inibitoria della cocaina e dei suoi analoghi sul DAT determina una riduzione della ricaptazione di dopamina e un conseguente incremento della concentrazione extracellulare del neurotrasmettitore liberato dalla terminazione nervosa. L'effetto della cocaina sulla trasmissione dopaminergica dipende quindi dalla liberazione esocitotica del trasmettitore provocata dall'impulso nervoso. Al contrario, la

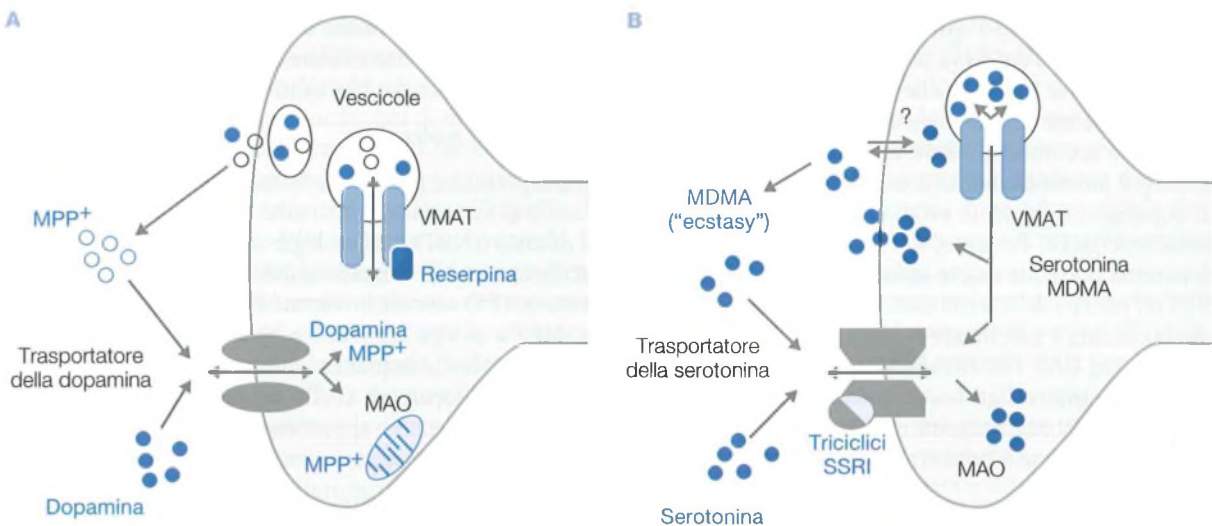


FIGURA 24.10 Neurotrasportatori e meccanismo d'azione di farmaci e tossici. **A.** Tossicità dell'1-metil-4-fenil piridinio (MPP⁺). L'MPP⁺, il metabolita neurotossico dell'MPTP, è trasportato all'interno dei neuroni dal DAT. In condizioni patologiche, il deficit funzionale del VMAT può provocare un aumento della suscettibilità alle tossine analoghe a MPP⁺. La vulnerabilità alle neurotossine può essere ulteriormente aggravata da una ridotta capacità funzionale del VMAT, ad esempio per mancanza di energia necessaria per il funzionamento della pompa protonica o per azione di farmaci (reserpina). VMAT svolge un ruolo chiave nell'eliminazione delle tossine dal citoplasma e di conseguenza nella limitazione del danno mitocondriale. **B.** Le amfetamine e i loro analoghi neurotossici altamente lipofili come l'MDMA ("ecstasy") sono substrati sia del DAT che del trasportatore della serotonina. L'amfetamina e l'MDMA possono inoltre entrare nei terminali nervosi per semplice diffusione, spiazzare le ammine biogene dalle vescicole dove sono immagazzinate e in definitiva indurre la fuoriuscita di serotonina per mezzo di un meccanismo di funzionamento invertito del trasportatore. Sebbene la capacità dell'MDMA di liberare dopamina sia probabilmente alla base delle sue proprietà di rinforzo, l'MDMA è anche un potente agente liberatore di serotonina e la sua somministrazione a lungo termine ha come conseguenza la degenerazione tossica dei terminali serotoninergici. La liberazione di serotonina e gli effetti neurotossici indotti dall'MDMA possono essere prevenuti dagli inibitori tri- ed eterociclici della ricaptazione della serotonina.

stimolazione della trasmissione dopaminergica prodotta dall'amfetamina è indipendente dall'impulso nervoso, dato che avviene per inversione della direzione di trasporto del neurotrasmettitore attraverso il DAT (vedi **CD**: Approfondimento 24.4. *Meccanismo d'azione dell'amfetamina*). Questo effetto è conseguente al trasporto dell'amfetamina all'interno della terminazione e alla disponibilità di siti di legame per la dopamina sul DAT rivolto verso l'interno della membrana.

Le interazioni della cocaina e dell'amfetamina con la neurotrasmissione dopaminergica sono alla base dei loro effetti psicostimolanti e della loro capacità di provocare dipendenza psichica. La delezione selettiva (knockout) del gene per il DAT nei topi determina un drammatico incremento dell'attività motoria basale negli omozigoti rispetto ai controlli. Inoltre, i topi mutanti non mostrano alcun aumento dell'attività motoria in risposta alla somministrazione di dosi elevate di cocaina o amfetamina. Questi dati confermano l'ipotesi che il DAT costituisce il sito di origine delle azioni stimolanti motorie della cocaina e dell'amfetamina.

Tuttavia, contrariamente a quanto previsto dall'ipotesi dopaminergica sui meccanismi che determinano la dipendenza da farmaci psicostimolanti, si è osservato che i topi mutanti privi di DAT sono capaci di apprendere ad autosomministrarsi la cocaina e a ricercarne gli effetti. Questi risultati non sono necessariamente contrari all'ipotesi che gli effetti gratificanti della cocaina siano mediati dal blocco del DAT nell'animale normale, ma possono invece indicare che esistono meccanismi alternativi attraverso i quali la cocaina può provocare gratificazione, tra cui il più probabile è il blocco del NET. Infatti nelle aree cerebrali che fanno parte dell'amigdala estesa e delle sue aree di transizione (ad esempio, "shell" del nucleo accumbens), dove la cocaina provoca gli aumenti più pronunciati della concentrazione extracellulare di dopamina, è presente un'alta densità di terminazioni noradrenergiche. Pertanto, nei mutanti privi di DAT, la dopamina potrebbe essere in larga parte trasportata dal NET all'interno delle terminazioni noradrenergiche. Dato che la cocaina è un efficace e potente bloccante del NET oltre che del DAT, l'assenza del DAT nei mutanti potrebbe non diminuire significativamente la sua capacità di aumentare la concentrazione extracellulare di dopamina nelle aree suddette e produrre così effetti gratificanti.

DAT e malattie degenerative del sistema dopaminergico

Data la sua localizzazione selettiva nelle cellule dopaminergiche, il DAT costituisce uno specifico marcatore di questi neuroni. Studi post mortem hanno dimostrato che DAT è ridotto nei soggetti affetti dal morbo di Parkinson. A conferma di questi dati, studi clinici mediante la tecnica della tomografia a emissione di positroni hanno evidenziato diminuzioni significative sia del legame della [¹¹C]nomifensina (un ligando selettivo del DAT) nello striato sia dell'accumulo di [¹⁸C]fluorodopa nel putamen di pazienti affetti da morbo di Parkinson.

Il DAT svolge un ruolo essenziale nella degenerazione del sistema dopaminergico nigrostriatale indotta dallo ione 1-metil-4-fenil piridinio (MPP⁺), il metabolita neurotossico dell'MPTP. Infatti, quest'ultimo viene concentrato nelle terminazioni nervose dopaminergiche attraverso il DAT (Figura 24.10). Per quanto riguarda il ruolo dei sistemi monoaminergici nel mediare gli effetti dei farmaci antidepressivi, vedi **CD**: Approfondimento 24.3.

I trasportatori per la noradrenalina e l'adrenalina

■ Sono trasportatori non selettivi

Le terminazioni nervose che liberano noradrenalina (NA) e adrenalina (A) hanno sulla loro membrana trasportatori in grado di ricaptare le ammine liberate. Questi trasportatori hanno però la peculiarità di non essere ciascuno selettivo per la propria ammina e di essere perciò in grado di ricaptare anche ammine diverse, seppure con diversa efficienza. Ad esempio, il trasportatore per la noradrenalina (NET) trasporta con maggiore efficienza (V_{max}) la NE, ma può interagire anche con la dopamina (DA) che lega addirittura con maggiore affinità. La capacità del NET di trasportare la DA è alla base di una importante interazione tra trasmissione dopaminergica e farmaci capaci di bloccare specificamente il NET. Infatti, in aree cerebrali dove la densità di terminazioni noradrenergiche è elevata rispetto a quella delle terminazioni dopaminergiche, come ad esempio la corteccia prefrontale, il NET partecipa in misura consistente a "ripulire" lo spazio extracellulare dalla DA liberata dalle terminazioni dopaminergiche. In queste condizioni, un bloccante del NET come la desipramina, può causare un aumento più robusto della concentrazione extracellulare di DA nelle aree corticali di quello provocato dai bloccanti specifici del DAT.

■ Struttura molecolare

Il trasportatore per la noradrenalina (NA) (Tabella 24.3) è stato clonato da cellule umane (hNET), bovine (bNET) e di ratto (rNET). Le omologie tra le sequenze amminoacidiche dei NET umano (hNET), bovino (bNET) e di ratto (rNET) sono molto elevate (intorno al 93% tra hNET e rNET e al 91% tra rNET e bNET), mentre è inferiore l'omologia tra la sequenza amminoacidica del trasportatore per la dopamina (DAT) e quella del NET (~65%). Questo trasportatore appartiene alla famiglia dei trasportatori Na⁺/Cl⁻-dipendenti con i quali ha in comune varie caratteristiche sia strutturali che funzionali; a differenza di SERT, NET non è influenzato dalla concentrazione degli ioni K⁺. Il NET possiede dodici domini transmembranari (TM1 – TM12), estremità amminoterminali e carbossi-terminali a localizzazione intracellulare e una lunga ansa extracellulare tra i segmenti transmembranari TM3 e TM4. La sequenza amminoacidica contiene vari siti di potenziale glicosilazione nell'ansa tra TM3 e TM4 e di fosforilazione da parte di varie proteinchinasi. Inoltre, nel secondo segmento transmembranario è presente un motivo a chiusura lampo di leucina che può costituire un punto di attacco per proteine (codificate da geni immediati precoci) che contengono questo motivo (Figura

24.7A). NET (come pure DAT) possiede siti selettivi per il legame del neurotrasmettitore (TM9-TM12 ed estremità carbossi-terminale) e per gli antagonisti (TM5-TM8) (Figura 24.7A). I territori TM2 e TM3 sembrano invece essere importanti per regolare la V_{max} del trasporto dell'ammina. La lunga ansa extracellulare tra TM3 e TM4, che contiene almeno due siti di N-glicosilazione, sembrerebbe essere importante per regolare la localizzazione subcellulare del trasportatore.

Recentemente è stato clonato il trasportatore per l'adrenalina (A) dei gangli del simpatico di rana (fET). Questo trasportatore possiede un elevato grado di omologia (75%) con il NET umano e, come questo, ha un'alta affinità per gli antidepressivi triciclici (ad esempio, desipramina). L'fET ha una efficienza maggiore nel trasportare l'adrenalina rispetto all'NA e alla DA ($E > NE > DA$) mentre per l'hNET la relazione è invertita ($NE > DA > E$).

Il trasporto di noradrenalina si accompagna a una corrente depolarizzante

Il NET, così come altri trasportatori della stessa famiglia (DAT, SERT), mostra una conduttanza tipica di canali ionici. Così, nonostante la stechiometria del trasporto di NE preveda il trasferimento all'interno della membrana di un singolo ione Na^+ per ogni molecola di NA, studi di patch clamp dimostrano che ogni molecola di NA trasportata è accompagnata da un elevato numero di ioni Na^+ . Il NET è permeabile agli ioni Na^+ anche in condizioni di riposo, cioè quando il trasporto di NA non è operativo. In presenza di sufficienti concentrazioni extracellulari di NA, Na^+ e Cl^- , la NA si lega al trasportatore e viene traslocata nello spazio intracellulare. Per ciascuna molecola di NA trasportata dall'esterno all'interno della membrana, circa 300 ioni Na^+ entrano nella cellula attraverso il trasportatore. In condizioni di intensa attività del trasportatore, questa corrente di ioni Na^+ è sufficiente per depolarizzare la membrana cellulare. Questa depolarizzazione ha almeno due conseguenze: 1) quella di modificare l'eccitabilità della membrana, favorendo la generazione di potenziali d'azione a livello somato-dendritico e, al contrario, riducendo l'efficacia dell'esocitosi a livello delle terminazioni nervose e 2) quella di ridurre l'efficienza del trasportatore. In tal modo, la depolarizzazione della membrana per effetto del trasporto di NA fa parte di un processo di autoregolazione che mantiene il trasporto entro limiti predeterminati (omeostasi).

NET come bersaglio molecolare di farmaci antidepressivi, cocaina e simpaticomimetici indiretti

NET possiede varie caratteristiche farmacologiche che lo differenziano dal DAT, il trasportatore con il quale mostra la maggiore omologia. Gli antidepressivi triciclici (ad esempio, la desipramina) bloccano il NET con affinità di almeno 3 ordini di grandezza superiori a quella con cui bloccano il DAT (Tabella 24.3; vedi CD: Approfondimento 24.3). I due isomeri dell'amfetamina si legano al NET con uguale affinità mentre la D-amfetamina ha un'affinità maggiore per il DAT rispetto alla L-amfetamina (Tabella 24.3).

Oltre che dagli antidepressivi triciclici, il NET viene anche bloccato dalla cocaina e dal metilfenidato. Questi farmaci si legano al trasportatore, ma non sono substrati per il trasporto. L'amfetamina e altri farmaci simpaticomimetici indiretti (capaci cioè di mimare gli effetti delle catecolamine senza interagire con i relativi recettori) vengono invece trasportati all'interno della terminazione dove vengono scambiati con la noradrenalina; questa, a sua volta, si lega al trasportatore orientato verso l'interno e viene così traslocata all'esterno e liberata nel compartimento extracellulare. Questo meccanismo di trasporto per scambio è alla base della proprietà dell'amfetamina di liberare monoammine dalle rispettive terminazioni nervose. Esso spiega sia le proprietà della cocaina e di tutti gli antagonisti del NET di inibire la liberazione di NA indotta dall'amfetamina, sia il fatto che, contrariamente alla cocaina e agli antidepressivi, l'amfetamina è in grado di aumentare la concentrazione extracellulare di NA anche in assenza di attività esocitotica.

Trasportatori vescicolari H^+ -dipendenti

Il gradiente elettrochimico di ioni H^+ generato da una pompa protonica vescicolare fornisce l'energia per il trasporto dei neurotrasmettitori nelle vescicole sinaptiche

L'elevato gradiente di concentrazione generato dal trasporto dei neurotrasmettitori all'interno delle vescicole sinaptiche richiede un notevole consumo di energia. In tutte le vescicole sinaptiche attualmente note, l'energia necessaria per il trasporto dei neurotrasmettitori proviene dal gradiente elettrochimico di ioni H^+ generato da una pompa di protoni (ATPasi) localizzata nella membrana delle vescicole (Figura 24.1B). Questa pompa presenta una notevole omologia di sequenza e una sensibilità ai farmaci simile a quella che genera il gradiente di protoni negli endosomi e nei lisosomi. È quindi probabile che i granuli di secrezione e le vescicole sinaptiche condividano la stessa origine evolutiva.

La pompa di protoni vescicolare accoppia l'idrolisi dell'ATP citoplasmatico al trasporto di ioni H^+ all'interno delle vescicole sinaptiche. A seconda della permeabilità ionica della membrana vescicolare, il trasporto di protoni all'interno delle vescicole può generare un gradiente di ioni H^+ , un potenziale di membrana o entrambi. Se la vescicola sinaptica è permeabile a un anione quale ad esempio il Cl^- , il trasporto di protoni all'interno della vescicola genera una corrente di ioni negativi verso l'interno che tende ad annullare il gradiente elettrico. In questo caso, si crea un gradiente di protoni senza alterazione del potenziale di membrana. Se invece gli anioni non possono attraversare la membrana vescicolare alla stessa velocità degli ioni H^+ , il trasporto di protoni genera un potenziale elettrico che limita il loro ulteriore trasporto. Sia in un caso che nell'altro, la pompa di protoni vescicolare provvede a fornire l'energia necessaria per il trasporto contro gradiente del neurotrasmettitore da parte del trasportatore vescicolare.

I trasportatori vescicolari costituiscono una famiglia di proteine geneticamente e farmacologicamente distinta da quelle dei neurotrasportatori della membrana plasmatica. Il trasporto vescicolare è infatti inibito da farmaci quali la reserpina e la tetrabenazina (per le ammine), e il vesamicolo (per l'acetilcolina) che sono inattivi sui trasportatori della membrana plasmatica (Tabella 24.4). Quattro diversi sistemi di trasporto vescicolare sono stati identificati: il primo per le monoammine, il secondo per l'acetilcolina, il terzo per l'acido glutammico e il quarto per il GABA e la glicina. Negli ultimi anni, i cDNA codificanti i trasportatori vescicolari per le monoammine (*Vesicular Monoamine Transporter*, VMAT1 e VMAT2), per l'acetilcolina (*Vesicular Acetylcholine Transporter*, VACHT) e per il GABA (*Vesicular GABA Transporter*, VGAT) sono stati isolati e caratterizzati (Tabella 24.4).

I trasportatori vescicolari delle monoammine

Il meccanismo di trasporto vescicolare meglio caratterizzato è quello coinvolto nell'immagazzinamento delle catecolamine nei granuli delle cellule cromaffini. In questi granuli, la pompa di protoni genera sia un gradiente di concentrazione di ioni H^+ (pH intravescicolare: 5,5) sia un potenziale di membrana di 60 mV (interno positivo). Il trasportatore lega le catecolamine, che si trovano nel citoplasma in forma non ionizzata (cioè con carica netta uguale a zero), e le trasloca nello spazio intravescicolare dove, a causa del pH acido, il gruppo aminico viene rapidamente protonato. Concentrate in forma protonata nei granuli cromaffini, le catecolamine non possono attraversare la membrana vescicolare per ritornare nel citoplasma cellulare e rimangono così intrappolate all'interno (Figura 24.1B). Nei granuli delle cellule cromaffini e nelle vescicole sinaptiche monoaminergiche si trova inoltre un trasportatore di nucleotidi che, mediante un meccanismo accoppiato al gradiente elettrochimico di protoni, accumula nucleotidi di adenina nelle vescicole. La formazione di complessi insolubili tra questi nucleotidi di adenina (ATP) e le catecolamine costituisce un meccanismo fondamentale per la regolazione dell'equilibrio osmotico tra i compartimenti intravescicolare e citoplasmatico.

Le vescicole che si sono svuotate in seguito alla liberazione del neurotrasmettitore contengono elevate concentrazioni di Na^+ e Cl^- . La diffusione di questi ioni verso il citoplasma, secondo il gradiente di concentrazione, contribuisce a generare parte dell'energia necessaria per il trasporto di trasmettitori o nucleotidi all'interno delle vescicole (per maggiori dettagli sulla dinamica delle vescicole sinaptiche, vedi Capitolo 32).

Farmacologia del trasportatore vescicolare delle monoammine

Diversamente dai trasportatori della membrana plasmatica per la dopamina, la noradrenalina e la serotonina, che possiedono affinità preferenziale per i rispettivi substrati, il trasportatore vescicolare ha affinità molto simili per le diverse monoammine. La reserpina, un potente farmaco antipertensivo, previene il trasporto delle ammine biogene all'interno delle vescicole sinaptiche e dei granuli cromaffini causando in tal modo la deplezione delle riserve intravescicolari di neurotrasmettitore. La reserpina si lega in modo irreversibile al VMAT e determina una inibizione di tipo competitivo del trasporto dei substrati aminici (Figura 24.10). Altri inibitori, quali l'MPP⁺ e la tetrabenazina, interagiscono con siti diversi del trasportatore e, pertanto, non antagonizzano il legame della reserpina al VMAT. Tuttavia, il trasporto dell'MPP⁺ all'interno delle vescicole sinaptiche viene efficacemente inibito sia dalla reserpina che dalla tetrabenazina (Figura 24.10). È importante sottolineare che la tetrabenazina, che è stata per lungo tempo impiegata per curare disturbi del movimento tra i quali i tic e le distonie, provoca una deplezione delle ammine molto più pronunciata a livello centrale che non a livello periferico. La [¹¹C] tetrabenazina è stata utilizzata per studiare in vivo la distribuzione del VMAT nel cervello umano attraverso la tomografia a emissione di positroni.

Struttura molecolare dei VMAT

La determinazione delle sequenze dei cDNA che codificano i VMAT nella midollare della surrenale e nel cervello di ratto ha portato alla identificazione di due proteine di

TABELLA 24.4 Famiglia dei neurotrasportatori della membrana plasmatica Na^+/Cl^- -dipendenti. Trasportatori delle monoammine

cDNA	Struttura molecolare	Substrato	Inibitori
Trasportatore delle monoammine (VMAT)	VMAT1 (ratto) 512 aa 12 TM Cellule cromaffini	NE ~ DA ~ 5-HT ~ E >> MPP ⁺	RES > TB ~ metamfetamina
	VMAT2 (ratto) 521 aa SNC	NE ~ DA ~ 5-HT ~ E ~ MPP ⁺	TB ~ metamfetamina > RES
Trasportatore dell'acetilcolina (VACHT)	VACHT (ratto) ≈ 500 aa 12 TM Terminazioni nervose colinergiche	Acetilcolina	Vesamicolo
Trasportatore del GABA (VGAT)	VGAT (ratto) ≈ 500 aa 10 TM Terminazioni nervose GABAergiche e glicinerghiche	GABA Glicina	γ-vinil-GABA (vedi testo)

Vesamicolo: trans-2-(4-enilpiperidino) cicloesano; RES: reserpina; TB: tetrabenazina.

rispettivamente 512 e 521 amminoacidi. Queste proteine, che presentano un elevato grado di omologia, sono state denominate VMAT1 e VMAT2.

Entrambi i trasportatori hanno 12 potenziali segmenti transmembranari, terminali aminico e carbossilico intracitoplasmatici e una lunga ansa intraluminale localizzata tra i primi due segmenti transmembranari. Questi ultimi probabilmente partecipano alla traslocazione del substrato e al legame degli inibitori. I VMAT hanno la proprietà di proteggere i neuroni dagli effetti tossici dell'MPP⁺ attraverso la sequestrazione intravesicolare di questo composto e la conseguente limitazione del danno mitocondriale (Figura 24.10). I trasportatori VMAT1 e VMAT2 hanno una diversa distribuzione anatomica e differiscono inoltre nelle loro caratteristiche funzionali: VMAT1 è espresso predominantemente nelle cellule cromaffini della midollare della surrenale e possiede una minore affinità per tutte le monoammine rispetto al VMAT2, il neurotrasportatore cerebrale. Nel sistema nervoso centrale, il VMAT2 è espresso dalle diverse popolazioni di neuroni dopaminergici, noradrenergici, adrenergici, serotonergici e istaminergici. La tetrabenazina e la metamfetamina inibiscono il VMAT2 con una potenza molto superiore a quella con cui inibiscono il VMAT1. VMAT espressi nel mesencefalo e nelle piastrine dell'uomo sono codificati da un unico gene. Di particolare interesse è il ruolo dell'ansa intraluminale compresa tra i segmenti transmembrana I e II coinvolta nel legame di MPP⁺ al trasportatore: in questa regione le differenze in sequenza amminoacidica tra il ratto e i primati sono abbastanza marcate e probabilmente responsabili della differente suscettibilità all'effetto neurotossico dell'MPP⁺ dei primati rispetto al ratto (che è resistente). Ciò suggerisce che questa porzione del trasportatore possa essere suscettibile di mutazioni capaci di determinare una riduzione della capacità del VMAT cerebrale di rimuovere neurotossine o di regolare la concentrazione della dopamina citoplasmatica trasportata all'interno del neurone dal DAT. Disfunzioni congenite (o acquisite) di VMAT potrebbero aumentare la sensibilità alle tossine esogene ed endogene capaci di provocare la degenerazione dei neuroni dopaminergici ed essere quindi coinvolte nella genesi delle lesioni dei sistemi aminergici, come nel caso del morbo di Parkinson. In questo contesto è interessante notare come in modelli sperimentali di senescenza cerebrale si sia osservata una riduzione dell'espressione di VMAT parallela alla riduzione della popolazione di neuroni dopaminergici.

Il trasportatore vescicolare dell'acetilcolina

Le terminazioni nervose colinergiche sono arricchite di un trasportatore vescicolare H⁺-dipendente per l'acetilcolina (VACHT) che è selettivamente inibito dal vesamicolo. Questo composto ha la capacità di prevenire l'accumulo vescicolare dell'ACh e di bloccare la neurotrasmissione colinergica.

La sequenza nucleotidica del cDNA per il VACHT di ratto codifica una proteina con 12 potenziali segmenti idrofobici transmembranari e le estremità ammino- e carbossi-terminale localizzate nello spazio extravescicolare (Tabella 24.3). La distribuzione del VACHT nei neuroni colinergici cerebrali e periferici è sovrapponibile a quella della colina acetil transferasi (ChAT), l'enzima di sintesi dell'ACh. È importante sottolineare che il cDNA del VACHT umano è privo di introne ed è contenuto all'interno della sequenza del primo introne del gene per la ChAT, situazione che è responsabile della regolazione coordinata dell'espressione delle due proteine.

I trasportatori vescicolari degli amminoacidi eccitatori, del GABA e della glicina

Diversamente dal trasporto vescicolare dell'acetilcolina e delle ammine biogene, che dipende principalmente dal gradiente di pH, il trasporto vescicolare del glutammato dipende quasi esclusivamente dal gradiente elettrico generato dalla pompa protonica a cavallo della membrana della vescicola, mentre il trasporto del GABA e della glicina dipende sia dal gradiente elettrico che da quello chimico. Non è stato ancora definitivamente stabilito se esistano due trasportatori vescicolari selettivi per il GABA e per la glicina o se invece entrambi amminoacidi siano concentrati all'interno delle vescicole dallo stesso trasportatore.

Il trasportatore vescicolare del GABA, detto VGAT, non è inibito dal glutammato, ed è sensibile all'acido nipecotico e al γ -vinil-GABA (Tabella 24.4). Quest'ultimo composto è un noto inibitore irreversibile della GABA-transaminasi, l'enzima di degradazione del GABA, e viene utilizzato nella terapia di alcune forme di epilessia.

Nel ratto, VGAT è una proteina contenente 10 potenziali segmenti idrofobici transmembranari e le estremità ammino- e carbossi-terminale localizzate nello spazio intravesicolare. La struttura molecolare è molto diversa da quella dei VMAT e del VACHT, e ciò suggerisce che il VGAT appartenga a una famiglia genica diversa. Oltre a essere localizzato nelle vescicole sinaptiche delle terminazioni nervose GABAergiche, VGAT è presente nel ratto anche nelle terminazioni nervose di neuroni dell'oliva superiore che contengono simultaneamente GABA e glicina e, con una densità più bassa, in neuroni che contengono soltanto glicina. Quest'ultimo dato suggerisce che il VGAT potrebbe essere coinvolto nel trasporto della glicina all'interno delle vescicole sinaptiche dei neuroni glicinergerici. In accordo con questa ipotesi, la trasfezione di cellule nervose in coltura con cDNA codificante VGAT determina la comparsa di attività di trasporto vescicolare sia del GABA ($K_m \approx 5$ mM) che della glicina ($K_m \approx 27$ mM). Infine, alcune popolazioni neuronali GABAergiche o glicinergeriche non possiedono VGAT: è possibile quindi che questi neuroni esprimano un neurotrasportatore vescicolare diverso non ancora identificato.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I neurotrasportatori regolano la concentrazione dei neurotrasmettitori nei compartimenti del sistema nervoso centrale e periferico.
- ▶ Il trasporto contro gradiente del trasmettitore da parte del neurotrasportatore è associato al cotrasporto secondo gradiente del Na^+ o del H^+ .
- ▶ I neurotrasportatori sono distinguibili, sulla base della loro struttura molecolare, della loro distribuzione subcellulare e delle loro proprietà farmacologiche in tre principali famiglie.
- ▶ Il trasportatore per la noradrenalina è in grado di captare anche la dopamina, precursore della noradrenalina.
- ▶ In aree cerebrali dove la densità di terminazioni noradrenergiche è elevata rispetto a quelle dopaminergiche, come ad esempio la corteccia prefrontale, il NET ha un ruolo superiore a quelle del DAT nel liberare lo spazio extracellulare dalla DA.

Bibliografia essenziale

- ▶ Amara SG. Neurotransmitter transporters. *Methods Enzymol* 1998;296:78-84.
- ▶ Buckley KM, Melikian HE, Provoda CJ, Waring MT. Regulation of neuronal function by protein trafficking: a role for the endosomal pathway. *J Physiol* 2000;525 Pt 1:11-9.
- ▶ Di Chiara G, Tanda GL, Frau R, Carboni E. Heterologous monoamine reuptake: lack of transmitter specificity of neuron-specific carriers. *Neurochem Int* 1992;20:231S-235S.
- ▶ Goldberg NR, Beuming T, Soyer OS et al. Probing conformational changes in neurotransmitter transporters: a structural context. *Eur J Pharmacol* 2003;479:3-12.
- ▶ Henry JP, Sagné C, Bedet C, Gasnier B. The vesicular monoamine transporter: from chromaffin granule to brain. *Neurochem Int* 1998;32:227-46.
- ▶ Klig KM, Galli A. Regulation of dopamine transporter function and plasma membrane expression by dopamine, amphetamine, and cocaine. *Eur J Pharmacol* 2003;479:153-8.
- ▶ Melandro MS, Kilberg MS. Molecular biology of mammalian amino acid transporters. *Ann Rev Biochem* 1996;65:305-36.
- ▶ Shan J, Javitch JA, Shi L, Weinstein H. Substrate-driven transition to an inward-facing conformation in the functional mechanism of the dopamine transporter. *PLoS One* 2011;6(1):e16350.
- ▶ Sulzer D, Galli A. Dopamine transport currents are promoted from curiosity to physiology. *Trends Neurosci* 2003;26:173-6.
- ▶ Yamashita A, Singh SK, Kawate T et al. Structure of a bacterial homologue of Na^+/Cl^- -dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 2005;437:215-23.

SEZIONE

7

Controllo della proteolisi

CAPITOLO 25

Capitolo 25

La proteolisi intracellulare

Fabio Di Lisa, Edon Melloni

CAPITOLO 26

La proteolisi extracellulare

Francesco Blasi

7

La proteolisi intracellulare

Fabio Di Lisa, Edon Melloni

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le conoscenze di base sulle caratteristiche strutturali e funzionali che differenziano le diverse famiglie di enzimi proteolitici
- ▶ Acquisire le nozioni relative ai meccanismi di regolazione dei diversi sistemi proteolitici intracellulari
- ▶ Comprendere come la conoscenza dei rapporti struttura-funzione delle proteasi ha permesso la definizione dei meccanismi di inibizione portando al disegno di nuovi farmaci
- ▶ Acquisire le conoscenze relative agli inibitori delle proteasi intracellulari di uso clinico

Caratteristiche generali delle proteasi

Le proteasi sono enzimi presenti in tutti i tessuti che idrolizzano i legami peptidici. Oltre a determinare il destino ultimo delle proteine, in molti casi la loro attività è coinvolta nello svolgimento di funzioni cellulari rilevanti attraverso l'attivazione o l'inattivazione di proteine enzimatiche. Quindi, anche se è innegabile che un'attività eccessiva delle proteasi è alla base di molte patologie e della morte cellulare, la proteolisi è indispensabile per la vita delle cellule, sia per quanto attiene al mantenimento dell'equilibrio ottimale tra sintesi e degradazione delle proteine, sia per la risposta a stimoli fisiologici o patologici.

La degradazione completa delle proteine negli amminoacidi costituenti si svolge per larga parte all'interno delle cellule e, in condizioni fisiologiche, è in perfetto equilibrio con la sintesi proteica. Oltre a questa forma di proteolisi "completa" sia nell'ambiente intracellulare che extracellulare si riconoscono molteplici esempi di proteolisi limitata. In questi casi le proteasi, intervenendo il più delle volte su siti specifici di idrolisi, frammentano la proteina bersaglio in uno o più peptidi. Questo tipo di proteolisi, che non si oppone, ma anzi affianca la sintesi proteica, può essere considerata una modificazione post-traslazionale delle proteine. Tuttavia al contrario di altre modificazioni covalenti delle proteine (come la fosforilazione), la proteolisi è irreversibile: l'unico modo per ricostituire la proteina degradata è infatti sintetizzarne una nuova. La proteolisi è dunque alla base di processi

irreversibili quali la coagulazione, l'apoptosi e la formazione di citochine, ormoni e neuropeptidi.

Classificazione

In tutte le proteasi l'idrolisi del legame peptidico si basa su una reazione acido-base generale iniziata dall'attacco di un gruppo nucleofilo del sito attivo dell'enzima sull'atomo di carbonio carbonilico peptidico (vedi **CD**: Approfondimento 25.1. *Terminologia delle proteasi*). Sulla base della diversa strategia utilizzata per l'attacco nucleofilo, le proteasi vengono suddivise in quattro classi principali: serina, cisteina, aspartico e metallo (nella maggior parte dei casi Zn^{2+}) proteasi. Nelle ultime due classi, il residuo di aspartico o lo ione metallico polarizzano una molecola d'acqua, cosicché l'atomo di ossigeno diviene il nucleofilo. Nelle altre classi invece il nucleofilo è rappresentato dall'ossidrile serinico in forma di ossianione, o dal sulfidrile della cisteina in forma di tiolato. L'attribuzione delle proteasi alle diverse classi è in gran parte basata sull'uso di inibitori specifici (Tabella 25.1). La ricerca di inibitori delle proteasi è in continuo sviluppo. Oltre alle possibili ricadute in campo farmacologico, tali molecole sono necessarie per differenziare e classificare le diverse proteasi, per isolarle e purificarle, avvalendosi della cromatografia di affinità e per determinarne la localizzazione mediante autoradiografia qualora non siano disponibili gli anticorpi per l'immunoistochimica. Nelle serina, cisteina e aspartico proteasi la proteina è generalmente ripiegata a formare due domini globulari

separati da una fessura contenente il sito attivo. La specificità delle diverse proteasi non è mai assoluta e dipende dall'interazione tra i residui prossimali al legame peptidico da idrolizzare e una parte del sito attivo, detta sito di posizionamento o di legame. Ad esempio, la presenza in questa regione della proteina substrato di residui carichi o idrofobici determina la diversa specificità rispettivamente della tripsina e della chimotripsina.

Nella tabella 25.2 viene presentato un quadro riassuntivo della localizzazione intracellulare dei principali enzimi appartenenti alle diverse classi di proteasi.

Serina proteasi

Comprendono essenzialmente proteasi extracellulari. Tra le serina proteasi intracellulari vengono classificate le proteasi che rimuovono la sequenza segnale (definite proteasi di segnale) di proteine che entrano nel reticolo endoplasmatico (vedi oltre). Infine, una famiglia a parte è costituita dal complesso endopeptidasi multiculturale, detto proteasoma (vedi oltre).

Cisteina proteasi

Questo gruppo è costituito prevalentemente da proteasi intracellulari. Il residuo catalitico di cisteina forma una coppia ionica con un residuo vicinale di istidina, che è quindi essenziale per l'attività catalitica. La coppia ionica influenza il grado di ionizzazione di entrambi i residui causando la deprotonazione del gruppo tiolico della cisteina che diviene un forte nucleofilo. Nelle proteasi cisteiniche è altamente conservato anche un residuo di asparagina, che orienta l'anello imidazolico dell'istidina. Si viene così a creare una triade catalitica simile a quella delle serina proteasi.

La papaina, isolata dalla papaya, è stata la prima cisteina proteasi caratterizzata. A essa è correlata la famiglia più abbondante delle cisteina proteasi. L'altra famiglia origina dall'enzima che converte l'interleuchina 1 β (ICE).

La famiglia della papaina comprende prevalentemente proteasi compartimentalizzate nei lisosomi. Nel citoplasma sono presenti altre proteine riconducibili alla papaina, ma differenziabili per una maggiore compless-

TABELLA 25.1 Inibitori delle proteasi utilizzati per la loro caratterizzazione

Residuo catalitico	Inibitori	Limiti o svantaggi
Serina	3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI)	Non inibisce alcune proteasi seriniche
	Diisopropil fluorofosfato (DFP)	Inibisce anche proteasi cisteiniche e l'acetilcolina esterasi
	Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF)	Inibisce anche proteasi cisteiniche; a lenta reattività
Cisteina	E64	
	Alchilanti -SH	Reagiscono con tutti i tioli
	Diazometani	Inibiscono alcune proteasi seriniche
	Leupeptina	Inibisce molte proteasi seriniche
Aspartico	Pepstatina	
Metalli (Zn ²⁺)	1,10 fenantrolina	

TABELLA 25.2 Distribuzione intracellulare e principali rappresentanti delle varie classi di proteasi

Residuo catalitico	Localizzazione	Enzimi principali	Inibitori endogeni
Serina	Lisosomi	Catepsina A	Serpine
	Reticolo	Peptidasi di segnale	
	Citosol	Proteasoma	
	Vescicole di secrezione	Peptidasi di maturazione	
	Granuli	Granzimi	
Cisteina	Lisosomi	Catepsine	Cistatine
	Citosol	Calpaina	Calpastatina XIAP
		Caspasi	
		Bleomicina idrolasi Deubiquitinasi	
Aspartico	Lisosomi	Catepsine	
	Citosol	Retropepsine	
Metalli (Zn ²⁺)	Reticolo e Golgi	Carbossipeptidasi	
	Mitocondri	Peptidasi di segnale	
	Plasma membrana (ectoenzimi)	Convertasi	

sità strutturale. Oltre alla calpaina, casi particolari sono rappresentati dalle deubiquitinasi, che idrolizzano il legame isopeptidico tra ubiquitina e proteine, e dalla bleomicina idrolasi coinvolta nella detossificazione di questo antibiotico.

La famiglia dell'ICE accomuna proteasi che mostrano una spiccata specificità per l'idrolisi di legami peptidici con l'aspartico in P₁. Da tale caratteristica, condivisa solo con un enzima dei granulociti detto granzima B, deriva il termine caspasi (*cysteiny* aspartate-specific proteases) che ha sostituito le nomenclature precedenti. Sono stati identificati tredici membri di questa famiglia cui è stato assegnato un numero progressivo in base all'ordine di comparsa in letteratura.

Aspartico proteasi

Questa classe comprende le "proteasi acide" già note all'inizio del secolo, come la pepsina secreta nel tratto digerente, o le proteasi lisosomiali catepsine D ed E.

Le strutture tridimensionali disponibili mostrano invariabilmente una forma a due lobi simili, ricordati da una breve sequenza (<10 residui). Una volta legato il substrato, il sito attivo si richiude sequestrando il substrato e una molecola d'acqua essenziale per la catalisi. Ciascuno dei due lobi fornisce uno dei due residui di aspartico necessari per la catalisi in quanto polarizzano la molecola d'acqua.

Le aspartico proteasi espresse nelle cellule dopo infezione con alcuni retrovirus, tra cui quello dell'immunodeficienza umana (HIV), sono comprese nella famiglia della retropepsina. La morfologia è sempre bilobata, ma questi enzimi sono omodimeri.

Metallo proteasi

È la classe più eterogenea di proteasi suddivisa in oltre 30 famiglie. Lo ione metallico più rappresentato è lo Zn²⁺. Una superfamiglia di queste proteasi, specificamente inibita dal fosforamidone, comprende la famiglia della neprilina costituita da ectoenzimi. Tra loro si annoverano la stessa neprilina, o encefalinasi, o NEP, che degrada, inattivandoli, diversi peptidi con attività biologica e l'enzima che converte l'endotelina (ECE) che genera il peptide vasoattivo endotelina a partire dal precursore grande endotelina-1. Da un punto di vista strutturale appartengono a questa famiglia anche le glicoproteine di Kell localizzate sulla membrana eritrocitaria e contenenti i 24 determinanti antigenici dei gruppi sanguigni. Tali proteine, sebbene presentino la struttura del sito catalitico omologa a quella della neprilina, non mostrano attività catalitica. Sono metallo proteasi, anch'esse localizzate nella plasma membrana, le peptidasi dell'orletto a spazzola intestinale e l'enzima, abbreviato con l'acronimo ACE, che converte l'angiotensina I nel peptide ipertensivante angiotensina II. Il gruppo di metallo proteasi insensibili al fosforamidone comprende endopeptidasi che degradano la matrice extracellulare, tra cui le collagenasi, ed enzimi intracellulari, quali oligopeptidasi e carbossipeptidasi necessarie per la maturazione di peptidi con attività biologica e ormoni e peptidasi di segnale localizzate nei mitocondri.

Alcune metallo proteasi vengono introdotte nella cellula da agenti infettivi. È il caso delle tossine tetanica e botuliniche, attivate per proteolisi nel citoplasma dell'ospite (vedi Capitolo 32). L'enzima prodotto dalla leishmania, leishmaniolisina, si localizza nei lisosomi e rappresenta un esempio di adattamento all'ambiente, essendo una delle rarissime metallo proteasi attive a pH acido.

Caratteristiche e regolazione della proteolisi intracellulare

I due processi intracellulari richiedono, a differenza dei sistemi extracellulari, la disponibilità di ATP. La degradazione lisosomiale utilizza l'ATP per acidificare le vescicole mediante una pompa protonica, mentre la degradazione da proteasoma richiede ATP a livello della poliubiquitinazione del substrato e della successiva demolizione. L'idrolisi esoergonica dell'ATP, accoppiata in queste condizioni alla proteolisi, favorisce ulteriormente il completamento del processo già di per sé termodinamicamente favorevole. Un'ulteriore differenza rispetto ai sistemi extracellulari è rappresentata dal controllo ormonale di alcuni processi proteolitici intracellulari, come l'autofagia (vedi **CD**: Approfondimento 25.2. *L'autofagia*).

La proteolisi in generale, e quella intracellulare in modo particolare, deve essere soggetta a uno stretto controllo sia spaziale che temporale per evitare la degradazione indiscriminata e continua di tutte le proteine che porterebbe in breve tempo alla distruzione dei tessuti.

Diversi fattori intervengono a regolare la proteolisi intracellulare.

- **Compartimentalizzazione.** È la risposta principale della cellula alla necessità di salvaguardare le proprie strutture. Inoltre, la compartimentalizzazione di più enzimi che partecipano allo stesso processo metabolico facilita l'interscambio di substrati e aumenta considerevolmente la velocità complessiva del processo. A questo riguardo divengono particolarmente importanti quei processi di modificazione post-trasduzionale delle proteine che ne determinano l'indirizzamento e l'attivazione.
- **Conversione di zimogeni.** Le proteasi sono in genere sintetizzate in forma di precursori inattivi (zimogeni) che vengono attivati per proteolisi. Essendo questa la tappa limitante di questi processi proteolitici, è necessario che sia sottoposta a controllo. Infatti, la conversione zimogeno-enzima attivo avviene di solito in condizioni specifiche (ad esempio a pH acido), o in risposta a segnali specifici che possono originare all'interno o all'esterno della cellula.
- **pH.** Diverse proteasi sono scarsamente attive a pH neutro, essendo ottimizzate per funzionare nei compartimenti acidi (lisosomi ed endosomi). In tali siti la parziale denaturazione dei substrati, determinata dal basso pH, favorisce l'attività proteolitica.
- **Stato redox.** Nelle cisteina proteasi il gruppo tiolico è facilmente ossidabile, per cui questi enzimi necessitano di un ambiente riducente che negli endosomi viene mantenuto mediante l'accumulo di cisteina.

- Inibitori.** L'attività di diverse proteasi intracellulari, e delle proteasi citoplasmatiche in particolare, è controllata dall'equilibrio con peptidi inibitori, presenti generalmente in eccesso rispetto all'enzima. Questo è senza dubbio il meccanismo di regolazione più selettivo predisposto dalla cellula. Sono noti diversi inibitori proteici delle serina proteasi, raggruppati nella famiglia delle serpine (*serine protease inhibitors*), localizzati soprattutto in ambito extracellulare. Sono tuttavia presenti anche all'interno delle cellule di diversi tessuti (rene, pancreas endocrino, alcune aree cerebrali, intestino tenue) anche se non sono noti i bersagli, né è chiaro il ruolo fisiologico. I più diffusi inibitori proteici delle cisteina proteasi rientrano nel gruppo delle cistatine suddiviso in tre famiglie. Le proteine oligomeriche che compongono la famiglia 1 sono localizzate nel citoplasma, mentre i membri delle altre famiglie sono presenti in ambito extracellulare. L'inibizione reversibile di tipo competitivo è rivolta soprattutto alle proteasi simili alla papaina. L'attività della calpaina viene inibita specificamente dalla calpastatina, mentre le caspasi sono inibite sia da proteine endogene, sia da proteine esogene introdotte da agenti infettivi. Non sono invece noti inibitori proteici endogeni delle aspartico e delle metallo proteasi. Questo spiega in parte l'elevata patogenicità di alcuni agenti infettivi.

Oltre al catabolismo proteico, la degradazione di proteine intracellulari assume significati biochimici e fisiologici completamente diversi nel caso della proteolisi limitata, che si realizza non solo nella conversione degli zimogeni in forme attive, ma anche nella formazione di nuovi enzimi o peptidi con funzioni diverse e specializzate rispetto a quelle della proteina nativa. Questa particolare caratteristica della proteolisi intracellulare è ben esemplificata in alcuni processi di trasduzione del segnale descritti in dettaglio nei paragrafi successivi. In generale le proteasi possono partecipare ai processi di trasduzione del segnale a tre livelli.

- a.** Attivazione di una via specifica di trasduzione del segnale. In seguito alla comparsa di un secondo messaggero (ad esempio il Ca^{2+}), o all'interazione con specifici effettori proteici, la proteolisi intracellulare viene attivata per innescare a sua volta una cascata di altre attività enzimatiche determinanti per la risposta cellulare.
- b.** Modulazione dell'attività dei recettori. La proteolisi del dominio intracellulare di queste proteine transmembrana ha risvolti funzionali che possono, a seconda dei casi, generare attivazione o repressione delle funzioni specifiche del recettore.
- c.** Regolazione del numero dei recettori. Una volta internalizzati per endocitosi, i recettori di membrana possono essere riciclati alla membrana o degradati a livello lisosomiale. Il numero di recettori presenti in una cellula è dettato dal fine equilibrio esistente tra i processi di internalizzazione-degradazione e di sintesi-inserzione (vedi Capitolo 6).

Funzioni e modulazione farmacologica dei principali sistemi proteolitici intracellulari

Nelle cellule la degradazione completa delle proteine è svolta dagli enzimi lisosomiali e dal proteasoma. I primi si occupano prevalentemente della rimozione di proteine provenienti dall'ambiente extracellulare e intracellulare raccolte in vescicole, mentre una parte delle proteine intracellulari viene degradata mediante il proteasoma. Poiché anche il proteasoma è assimilabile strutturalmente a un compartimento intracellulare (vedi oltre), la necessità di sequestrare la proteina da degradare in particolari siti rappresenta al contempo una forma di controllo e una differenza rilevante rispetto alla proteolisi extracellulare. Per meglio definire il ruolo dei diversi sistemi proteolitici e le possibilità di modulazione farmacologica è opportuno considerare e raggruppare le proteasi non già sulla base dei loro meccanismi di catalisi, ma delle funzioni più rilevanti svolte all'interno delle cellule.

Occorre premettere che la scarsa specificità degli inibitori e la difficoltà di bloccare le sole funzioni dannose limitano nella pratica clinica la disponibilità di farmaci diretti contro le proteasi intracellulari. Come descritto in dettaglio nei paragrafi successivi, al momento interventi terapeutici di questo tipo riguardano il proteasoma nell'ambito delle proteasi endogene e la metalloproteasi sintetizzata a seguito dell'infezione da HIV. Gli effetti collaterali provocati dagli inibitori di quest'ultima proteasi sottolineano come sia difficile all'interno della cellula ottenere un effetto benefico dall'inibizione delle proteasi responsabili di eventi patologici.

Proteasi lisosomiali

La maggior parte delle proteine intracellulari viene rimossa per proteolisi dal sistema ubiquitina proteasoma nel citoplasma (descritto più avanti) e da svariate proteasi all'interno dei lisosomi. La proteolisi lisosomiale è prevalentemente aspecifica e diretta contro proteine sia esogene, sia endogene. Le proteine da degradare nei lisosomi vengono convogliate nei lisosomi mediante sistemi di vescicolazione e trasporto (Figura 25.1). Tali sistemi vengono raggruppati con il termine eterofagia nel caso della digestione delle proteine provenienti dall'ambiente extracellulare, mentre per le proteine intracellulari si usa il termine autofagia.

Le proteine dell'ambiente extracellulare sono portate all'interno attraverso i processi di endocitosi legata al recettore, pinocitosi e fagocitosi. Le vescicole formate dall'invaginazione della membrana plasmatica sono dette vacuoli eterofagici e fondono poi con i lisosomi primari. Le proteine intracellulari possono essere incorporate nei lisosomi in modo non selettivo o selettivo. La prima modalità si realizza attraverso la delimitazione di piccole porzioni di citoplasma, che possono contenere anche organelli, da parte di membrane derivate dal reticolo endoplasmatico rugoso. La degradazione del contenuto di

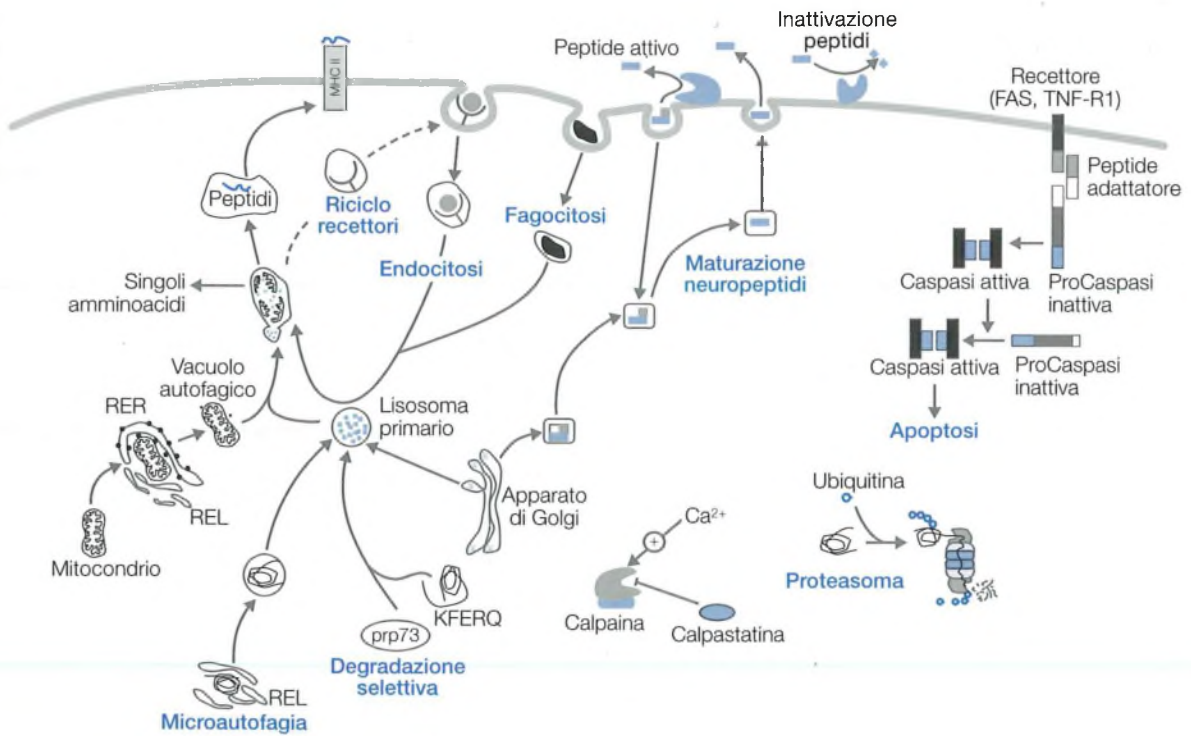


FIGURA 25.1 Quadro riassuntivo delle diverse modalità di proteolisi intracellulare. A sinistra è illustrato il ruolo dei lisosomi nei processi digestivi intracellulari. Vescicole originate dalla membrana plasmatica o dal reticolo endoplasmatico veicolano ai lisosomi componenti rispettivamente dell'ambiente extracellulare o intracellulare. Accanto a questa degradazione non selettiva legata a formazione di vescicole, alcune proteine recanti la sequenza Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) possono essere legate in modo specifico da una proteina di riconoscimento di 73 kDa (prp73) che le veicola nei lisosomi. La degradazione completa delle proteine operata all'interno dei lisosomi rende disponibili i singoli amminoacidi per il metabolismo cellulare. Dalla degradazione parziale si generano invece peptidi che vengono esposti sulla superficie cellulare legati alle proteine MHC di classe II. Nella metà destra della figura sono illustrati gli altri meccanismi di proteolisi, quali proteasi di maturazione dei peptidi, caspasi, proteasoma e calpaina, che vengono illustrati in maggior dettaglio nelle figure successive. RER: reticolo endoplasmatico rugoso; REL: reticolo endoplasmatico liscio.

queste vescicole, denominate vacuoli autofagici, procede nel lisosoma fino alla liberazione dei singoli amminoacidi, che possono essere poi riutilizzati per la sintesi proteica o la gluconeogenesi. Questo processo, detto macroautofagia, è strettamente correlato con lo stato nutrizionale, essendo attivato dal digiuno (glucagone) e soppresso dall'insulina. Inoltre, in modo ancora non precisato, l'autofagia dipende dalla disponibilità di ATP. Vescicole di minori dimensioni si formano direttamente a partire dai lisosomi nel processo definito microautofagia. Accanto a questi due processi non selettivi che coinvolgono diverse proteine contemporaneamente il quadro dell'autofagia è completato dal processo mediato da alcune HSC (*Heat Shock Proteins*), in particolare HSC70 e HSP90. Questo processo, indicato dall'acronimo CMA (*Chaperon-Mediated Autophagy*), è selettivo e coinvolge una sola proteina per volta (vedi CD: Approfondimento 25.2).

I lisosomi contengono svariati enzimi idrolitici tra cui numerose proteasi appartenenti ai vari tipi catalitici e a svariate famiglie

Esse sono accomunate dal termine catèpsine, derivante dalla fusione tra pepsina e catabolismo delle proteine, che indica al contempo la localizzazione intracellulare di

questi enzimi. L'identificazione recente di nuove catèpsine ha portato il numero a 11 nel caso dell'uomo (B, H, L, S, C, K, O, F, V, X e W) e tra queste si annoverano sia endopeptidasi, che esopeptidasi. Le più abbondanti sono la catèpsina D, una proteasi aspartica, e le catèpsine B ed L, proteasi cisteiniche. Tra le esopeptidasi spiccano la catèpsina A, una proteasi serinica, e la carbossipeptidasi B lisosomiale, una proteasi cisteinica. La presenza di diversi tipi di proteasi garantisce la degradazione di qualsiasi genere di proteina. È inoltre necessario stabilire una cooperazione tra le endopeptidasi, che generano frammenti superiori a 8 residui, e le esopeptidasi che completano la degradazione: la funzione delle endopeptidasi è essenzialmente quella di creare un numero maggiore di punti di attacco per le ammino-peptidasi e le carbossipeptidasi. Le proteasi lisosomiali sono concentrate in tali strutture attraverso un meccanismo di selezione che avviene a livello del trans-Golgi e che si basa sulla presenza di una specifica modificazione post-traduzionale: la presenza di residui di mannosio-6-fosfato. È descritta una rara anomalia congenita del sistema di fosforilazione del mannosio, detta mucopolipidosi II, caratterizzata da un ridotto contenuto lisosomiale di idrolasi acide. Oltre alla glicosilazione, altre modifiche post-traduzio-

nali sono necessarie per ottenere le proteasi lisosomiali in forma attiva. Vengono infatti sintetizzate in forma di *prepro* enzimi inattivi: la sequenza segnale, indicata dal suffisso *pre*, serve a indirizzare la proteina neoformata nel reticolo dove viene rimossa. All'interno dei lisosomi il distacco proteolitico della sequenza di inattivazione, indicata dal suffisso *pro*, rende attivo l'enzima.

I lisosomi, mediante una pompa protonica ATPasica, mantengono un pH interno di ~5 corrispondente al pH ottimale dell'attività degli enzimi in essi contenuti. La cellula è protetta contro perdite accidentali dei componenti lisosomiali, in quanto le catepsine sono in genere rapidamente inattivate a pH neutro. Questa regola riconosce tuttavia numerose eccezioni come dimostrano le recenti osservazioni di attività extralisosomiali delle catepsine. Un caso particolare è rappresentato dalla catepsina A che svolge funzioni di carbossipeptidasi, esterasi e deaminasi. Inoltre, legando nei lisosomi la β -galattosidasi e la neuraminidasi, le protegge dall'attività proteolitica degli altri enzimi lisosomiali. Alla deficienza di catepsina A fa seguito la sindrome di accumulo definita galattosialidosi, dovuta alla degradazione non più controllata delle due idrolasi.

Le catepsine sono anche responsabili di molti effetti intracellulari ed extracellulari

Alle catepsine, e a quelle cisteiniche in particolare, un tempo considerate soltanto coinvolte nella degradazione non selettiva delle proteine all'interno dei lisosomi, vengono oggi attribuiti compiti specifici in ambito intracellulare ed extracellulare per ruoli sia fisiologici, sia patologici. La catepsina S è la principale proteasi cisteinica coinvolta nell'esposizione degli antigeni legati alle proteine MHC di classe II (vedi Capitolo 39). La catepsina K, anch'essa cisteinica, è particolarmente espressa negli osteoclasti. È il più potente enzima elastinolitico ed è ritenuto rilevante il suo contributo al rimodellamento della matrice extracellulare, giustificando la sua inibizione come possibile terapia dell'osteoporosi. Studi più recenti indicano il coinvolgimento di diverse catepsine cisteiniche nell'apoptosi. Tali proteasi rilasciate nel citoplasma in seguito a un iniziale danno, soprattutto ossidativo, tagliando la Bid, una proteina proapoptotica, ne causano il legame ai mitocondri provocando il rilascio di citocromo c e l'attivazione sequenziale della caspasi 9 e delle caspasi 3.

Un ruolo delle catepsine nella morte cellulare programmata è suggerita anche da evidenze sperimentali che indicano un coinvolgimento di sistemi proteolitici solubili, tra cui il sistema proteolitico Ca^{2+} dipendente, nella rottura/permeabilizzazione della membrana lisosomiale (ipotesi della cooperazione catepsine-calpain). Questa cascata proteasica necrotica è stata osservata in organismi semplici, ma anche nell'uomo.

L'attività, l'espressione e la localizzazione di diversi membri della famiglia delle catepsine sono modificate in svariati tumori. In particolare, l'aumento dell'espressione e dell'attività delle catepsine B ed L correla invariabilmente con la progressione dei tumori maligni. Inoltre si

modifica la localizzazione che nello sviluppo tumorale non è più limitata ai lisosomi, ma può comprendere la plasma membrana e lo spazio extracellulare. Questa ultima localizzazione, per rilascio dalla cellula tumorale, potrebbe favorire l'azione di composti che mostrano scarsa permeabilità all'interno delle cellule, favorendo in tal modo una specificità di azione diretta contro la massa tumorale.

Accanto al ruolo nello sviluppo e nella malignità dei tumori, l'aumento di espressione della catepsina K è stato correlato con l'osteoporosi, mentre una iperattività della catepsina S è stata associata all'artrite reumatoide.

Strategie farmacologiche per il controllo delle catepsine

Diversi inibitori di queste catepsine, e in particolare della K, sono entrati nella sperimentazione clinica in fase I o II. Nella tabella 25.3 sono riassunte le osservazioni che correlano le diverse catepsine con patologie umane.

La mancanza di specificità assoluta, la molteplicità di forme, l'abbondanza e la cooperazione rendono difficoltosa l'ideazione di strategie terapeutiche basate sull'inibizione o sull'attivazione di una particolare proteasi. Tuttavia l'attività proteolitica lisosomiale può essere modificata da agenti in grado di penetrare in questi organelli alterandone le condizioni interne. Possono infatti realizzarsi: a) innalzamento del pH da parte di composti basici con inattivazione degli enzimi lisosomiali; b) inattivazione di una parte più o meno cospicua delle proteasi seguita dall'accumulo di proteine non degradate; c) rottura dei lisosomi e liberazione degli enzimi con grave compromissione dell'integrità cellulare; d) inattivazione dell'agente per modifica chimica o intrappolamento. Tali condizioni possono costituire effetti collaterali di farmaci o contribuire alla loro tossicità.

TABELLA 25.3 Coinvolgimento delle catepsine in patologie umane

Catepsina	Distribuzione	Patologia
B	Ubiquitaria	Infiammazione, Alzheimer, cancro
C	Ubiquitaria	Infiammazione
D	Ubiquitaria	Infiammazione, Alzheimer, cancro, artrite reumatoide
E	Sistema immune	Dermatiti
F	Ubiquitaria	Infiammazione
G	Neutrofili, linfociti B	Infiammazione
H	Ubiquitaria	Cancro
K	Epiteli	Artrite reumatoide
L	Ubiquitaria	Patologie timiche, aterosclerosi, artrite reumatoide, cancro
S	Cellule che presentano antigeni	Artriti, aterosclerosi, asma bronchiale, psoriasi, cancro
V	Ubiquitaria	Patologie timiche, cancro
W	Linfociti T e NK	Gastrite atrofica autoimmune
X	Ubiquitaria	Cancro

Per il largo coinvolgimento delle catepsine in patologie dell'uomo, lo sviluppo di nuovi strumenti di controllo delle loro attività sta ottenendo sempre più interessi farmacologici. Una delle strategie messa a punto più di recente si basa sull'individuazione delle proprietà comuni della struttura terziaria o delle specificità di legame del substrato che si può riscontrare nelle catepsine attraverso indagini ai raggi X. Una seconda strategia è invece indirizzata a caratterizzare nuovi modulatori positivi del sistema proteolitico lisosomiale per favorire l'eliminazione degli accumuli proteici che accompagnano patologie neurodegenerative come l'Alzheimer e la demenza fronto-temporale.

Proteasi compartimentalizzate con funzioni specifiche

Proteasi di segnale: le proteine vengono indirizzate negli organelli subcellulari mediante sequenze di riconoscimento che sono rimosse all'interno degli organelli dalle proteasi di segnale

Nel reticolo endoplasmatico questi enzimi si presentano in forma oligomerica con un numero variabile di subunità. Dai microsomi di pancreas di cane è stata isolata l'Spc (*Signal peptidase complex*), un complesso di 5 subunità con pesi molecolari tra 12 e 25 kDa. Solo una subunità è attiva cataliticamente, mentre le altre probabilmente regolano il processo di traslocazione della proteina da importare attraverso la membrana. Le peptidasi di segnale del reticolo, pur rientrando nel gruppo delle serina proteasi, presentano due caratteristiche peculiari: non sono inibite dagli inibitori comunemente usati per distinguere le varie classi di proteasi e non richiedono l'istidina nel meccanismo di catalisi. L'accettore di protoni è probabilmente un residuo assai conservato di aspartico in analogia a quanto avviene nella β -lattamasi dove tale funzione è svolta dal glutammico. Sia nei procarioti che negli eucarioti le proteasi di segnale mostrano una spic-

cata preferenza per piccoli amminoacidi idrofobici in P₁ e in P₃. La proteolisi è inoltre favorita dalla lisina in P'₁, mentre peptidi con un residuo di prolina in tale posizione agiscono da inibitori competitivi.

Nei mitocondri sono presenti almeno tre differenti tipi di proteasi di segnale. Il peptide di segnale delle proteine sintetizzate nel citoplasma e trasportate nei mitocondri viene rimosso dalla proteasi di maturazione mitocondriale. In talune proteine un ulteriore octapeptide viene rimosso dalla proteasi intermedia mitocondriale, appartenente alle metallo proteasi. Questi enzimi sono metallo proteasi a differenza della proteasi di segnale mitocondriale, una proteasi serinica che agisce sulle proteine sintetizzate all'interno dei mitocondri.

Proteasi di maturazione: prepropeptidi vengono convertiti in peptidi bioattivi per l'intervento di processi proteolitici

I peptidi sono sintetizzati in forma inattiva come *prepropeptidi* (Figura 25.2) (vedi Capitolo 40). Il suffisso *pre* indica la presenza all'estremità amminica della sequenza di segnale, mentre *pro* denota la presenza di un peptide inibitorio che deve essere rimosso per ottenere il peptide attivo. Alle proteasi di segnale del reticolo endoplasmatico rugoso è affidata la prima fase della maturazione, processo specifico in quanto simile per tutte le proteine solubili che entrano in questo organello. Il propeptide, rilasciato nel lume del reticolo e successivamente trasferito nell'apparato del Golgi, viene immagazzinato nelle vescicole di secrezione a livello delle cisterne del *trans*-Golgi insieme alle proteasi che completano il processo di maturazione. All'interno delle vescicole secretorie gemmate dal *trans*-Golgi, si compie la seconda fase della maturazione, un processo specifico, dipendente da un pH acido e catalizzato generalmente dall'azione sequenziale di due proteasi. Viene dapprima distaccato il propeptide tramite proteasi tripsino simili che riconoscono come segnale una coppia di residui basici (Arg-Arg, o Lys-Arg).

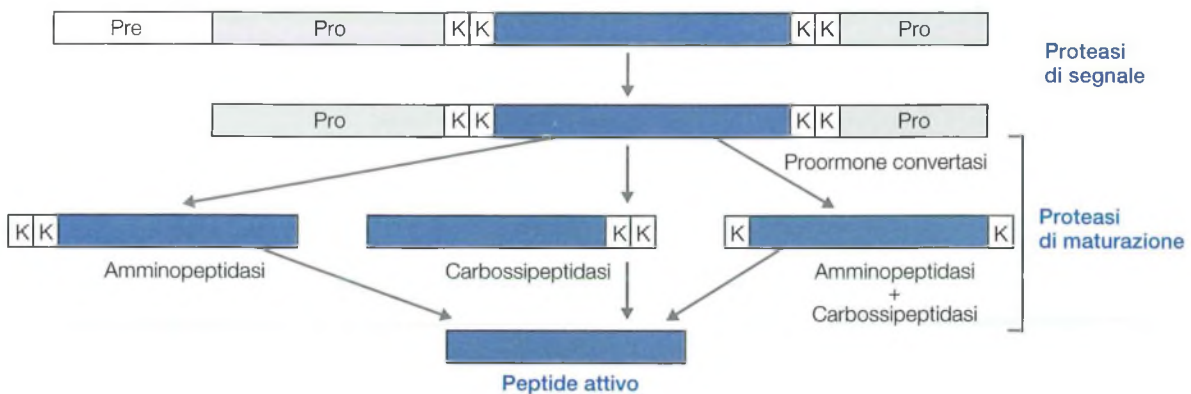


FIGURA 25.2 Processi di maturazione di peptidi con attività biologica. Peptidi quali neuropeptidi, ormoni e fattori di crescita sono sintetizzati come *prepropeptidi* inattivi. Peptidasi di segnale del reticolo rimuovono la sequenza *pre* di indirizzamento. Nelle vescicole di secrezione dal *propeptide* si ottiene il peptide attivo attraverso l'azione sequenziale di due proteasi. Un primo enzima tripsino-simile taglia il propeptide in corrispondenza di una coppia di amminoacidi basici. Aminopeptidasi o carbossipeptidasi intervengono successivamente a rimuovere i residui basici a seconda che questi restino rispettivamente all'estremità ammino- o carbossiterminale.

In base all'omologia con l'esina, una proteasi serinica del lievito coinvolta nella produzione dei ferormoni, è stato di recente caratterizzato un gruppo di proteasi in grado di degradare specificamente proormoni. Tali enzimi, definiti proormoni convertasi, sono sintetizzati in forma di zimogeni e richiedono per la loro attività ioni Ca^{2+} . I principali rappresentanti di questi enzimi, PC1 e PC2, sono stati rilevati esclusivamente nei tessuti endocrini e neuroendocrini, mentre un'ulteriore convertasi, la furina, presenta una distribuzione pressoché ubiquitaria e potrebbe fungere da convertasi di PC1 e PC2.

Nel caso che ambedue o un solo residuo basico del doppietto restino all'estremità C-terminale del peptide, vengono rimossi da metallo esopeptidasi tra cui la più importante è la carbossipeptidasi H (definita anche carbossipeptidasi E, o convertasi dell'encefalina), particolarmente abbondante nell'ipofisi anteriore. Nel caso in cui i residui basici siano localizzati all'N-terminale, essi verranno rimossi da aminopeptidasi. In altri casi ancora la maturazione dei peptidi si completa all'esterno della cellula a opera di metallo proteasi secrete e localizzate sulla plasma membrana (vedi oltre). In altri casi ancora, come ad esempio per la convertasi dell'endotelina, isoforme sono localizzate sia in sede extracellulare che all'interno del trans-Golgi, cosicché il peptide può essere secreto come precursore inattivo o direttamente in forma attiva. Da un singolo precursore vengono spesso prodotti più peptidi attivi che svolgono funzioni differenti. Inoltre la maturazione è tessuto-specifica, in quanto dallo stesso precursore possono originare diversi prodotti a seconda del tessuto considerato. Questi concetti sono esemplificati

dal destino della POMC (vedi Capitolo 32). Sono allo studio, diversi inibitori della maturazione intracellulare dei peptidi il cui impiego allo stato attuale è rivolto alla caratterizzazione e alla differenziazione delle varie proteasi coinvolte (Tabella 25.4). Lo sviluppo di inibitori della maturazione intracellulare dei peptidi è ostacolato da vari fattori tra cui: a) difficoltà di raggiungere non solo l'interno della cellula, ma addirittura uno specifico comparto intracellulare; b) difficile accessibilità del SNC; c) la scarsa specificità delle proteasi interessate; d) possibilità di effetti collaterali legati alla specificità tessutale (l'inibizione della produzione di un particolare peptide in un dato tessuto potrebbe accompagnarsi con il blocco indesiderato della formazione di altri peptidi in altri tessuti); e) conoscenze non complete dei meccanismi di base.

Le proteasi della membrana plasmatica regolano anche segnali recettoriali e sono un utile bersaglio farmacologico

Non solo la sintesi, ma anche la degradazione dei neuropeptidi, con il conseguente spegnimento del segnale da essi generato, vedono la partecipazione di proteasi. In questo caso si tratta di metallo proteasi localizzate sulla superficie esterna della membrana plasmatica (ectoenzimi). In questo gruppo l'enzima più caratterizzato è la neprililina.

La neprililina è costituita da un omodimero nel quale ciascuna subunità (peso molecolare 90-100 kDa) presenta una breve dominio N-terminale citoplasmatico, collegato attraverso un tratto transmembrana di 22 amminoacidi a una grande porzione extracellulare altamente glicosilata contenente il sito catalitico. Distribuita in diversi tessuti

TABELLA 25.4 Rilevanza sperimentale e clinica dei principali inibitori delle proteasi intracellulari e delle proteasi extracellulari della membrana plasmatica

Proteasi	Inibitori sperimentali con possibile sviluppo clinico	Possibili indicazioni	Inibitori di uso clinico	Indicazioni cliniche
Proteasoma	Lattacistina, MG 132, MG115	Infiammazione, oncologia	Bortezomib, Carfilzomib, PR-047, NPI-0052, MLN9708	Mieloma multiplo
Peptidasi di segnale	Peptidil CMK (furina), acetil esapeptidi (PC1 e 2)	Produzione neuropeptidi, infezioni virali (furina)		
Caspasi	Ac-DEVD-CHO, Z-VAD-DCB, Ac-YVAD-CHN2	Apoptosi, malattie degenerative, sindromi ischemiche, infiammazione	Pralhacasan (inibitore ICE o caspasi 1)	Artrite reumatoide
Calpaina	Alo- e diazometani peptidici, aldeidi peptidiche, derivati α -mercaptoacrilato (PD150606)	Danno ischemico, neurodegenerazione, distrofia muscolare, cataratta		
Proteasi cisteiniche dei protozoi	Z-Phe-Ala-FMK	Infezioni da <i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> ecc.		
Proteasi HIV			Indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, amprenavir, lopinavir	AIDS
Neprililina	Fosforamidon, acetorfanio, chelatorfanio	Iperensione, dolore	Tiorfanio	Sindromi diarroidiche
ECE	FR901533, derivati acido aminofosfonico (CGS31477), fosforamidon	Aterosclerosi, ipertensione, tumore della prostata		
ACE			Captopril, enalapril	Iperensione

Le diverse proteasi sono state elencate in base alla classe di appartenenza e all'ordine di comparsa nel testo

(oltre che nel sistema nervoso centrale e periferico, anche nel rene, intestino tenue, corteccia surrenale, ovaio, testicolo, linfociti e neutrofilo) è in grado di degradare, oltre a diversi peptidi oppioidi, anche la sostanza P, la bradichinina, i peptidi natriuretici e il peptide chemiotattico fMet-Leu-Phe. Questa proprietà rende verosimile la partecipazione della neprilina alla modulazione della risposta infiammatoria. Infatti, i topi transgenici privati del gene della neprilina sono cento volte più suscettibili alla morte da shock endotossico.

L'indicazione clinica di un inibitore della neprilina, il tiorfano (Tabella 25.4), è ristretta alle sindromi diarroidiche sulla base del potente effetto esercitato dai peptidi oppioidi sulla peristalsi intestinale. L'estensione delle indicazioni è limitata dalla mancanza di selettività degli inibitori disponibili cui consegue, attraverso l'inibizione più o meno marcata di ACE ed ECE (vedi oltre), un'ampia gamma di effetti collaterali.

Per quanto riguarda i propeptidi secreti e attivati da metalloproteasi localizzate sulla superficie cellulare esterna, i casi più rilevanti sono rappresentati dalle convertasi dell'endotelina e dell'angiotensina II. Quest'ultimo enzima, anche se è tutt'altro che specifico in quanto agisce da carbossipeptidasi (il nome corretto è infatti peptidil dipeptidasi A) anche su bradichinina e sostanza P, è bersaglio di numerosi farmaci, i cosiddetti ACE inibitori, ampiamente utilizzati per la terapia dell'ipertensione (vedi **CD**: Approfondimento 25.3. *Inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina e loro azione nelle patologie cardiovascolari*). Il primo composto utilizzabile clinicamente è stato il captopril (D-3-mercapto-propanoil-L-prolina) nel quale il sulfidrilico funge da ligando per lo Zn^{2+} , aumentando il grado di inibizione ottenuto naturalmente dal carbossile dell'alanina nel dipeptide Ala-Pro, presente nel veleno di diversi serpenti, da cui il farmaco è derivato (Tabella 25.4). Il gruppo carbossilico della prolina forma inoltre un ponte salino con un residuo di arginina del sito catalitico stabilizzando l'interazione enzima-inibitore. Gli effetti collaterali del captopril dovuti proprio al gruppo tiolico sono stati in gran parte eliminati dalla seconda generazione di ACE antagonisti costituiti da carbossialchil dipeptidi. Per ulteriori dettagli su queste proteasi extracellulari vedi **CD**: Approfondimento 25.3.

Il successo terapeutico ottenuto con l'inibizione dell'ACE ha promosso lo sviluppo di inibitori di altri ectoenzimi e in particolare dell'ECE (*Endothelin Converting Enzyme*) (Tabella 25.4). Le indicazioni terapeutiche spaziano in questo caso dall'ipertensione, essendo l'endotelina il più potente vasocostrittore endogeno, alle lesioni vascolari e all'aterosclerosi, condizioni associate con un'aumentata sintesi di ECE. Sorprendentemente, l'iperproduzione di ECE accompagna anche l'evoluzione del carcinoma prostatico, per cui l'inibizione dei recettori dell'endotelina e dell'ECE è stata proposta come potenziale terapia per questa forma tumorale. I limiti nella ricerca di validi ECE antagonisti risiedono nella mancanza di selettività nei confronti della neprilina e nel fatto che parte dell'endotelina è attivata all'interno della cellula, ambiente che, come già sottolineato, offre una serie di ulteriori difficoltà.

Proteasi citoplasmatiche

Il proteasoma è un complesso multienzimatico che degrada le proteine anomale derivanti da mutazioni, avvolgimento erroneo o alterazioni prodotte dopo la loro sintesi

Molte proteine citosoliche e anche diverse di membrana vengono degradate a opera di un complesso multiproteico specifico, detto proteasoma. Il proteasoma è localizzato nel citoplasma e nel nucleo ed è in parte associato con il reticolo endoplasmatico e con il citoscheletro. Una delle caratteristiche importanti di questa via di degradazione è che le proteine da eliminare vengono "marcate" mediante l'aggiunta a livello di specifiche lisine di più copie di un peptide, detto ubiquitina. Sia i segnali che inducono l'ubiquitinazione che le tappe enzimatiche responsabili di questa importante modificazione post-traduzionale sono target di farmaci i cui effetti si riflettono non solo sul destino di alcune proteine, ma su diverse e complesse funzioni cellulari. Per l'analisi del sistema del proteasoma e delle tappe del processo di ubiquitinazione, vedi **CD**: Approfondimento 25.4. *Ubiquitina e proteasoma*.

Oltre alla proteolisi aspecifica delle proteine alterate, la degradazione specifica di alcune proteine da parte del proteasoma è necessaria per svariate funzioni cellulari. Gli esempi più rilevanti vengono riportati di seguito.

- **Ciclo cellulare.** L'ingresso nella fase M dipende dalla degradazione della ciclina B che viene ubiquitinata in prossimità del residuo N-terminale a opera di una specifica ligasi E3. Tale enzima viene attivato per fosforilazione al termine di una cascata di eventi fosforilativi legati all'attività della chinasi cdc2 (acronimo che indica il ciclo della divisione cellulare).
- **Ruolo della "degradazione associata al reticolo endoplasmatico" (ERAD).** Il proteasoma 26S partecipa anche al meccanismo noto come controllo di qualità che ha luogo nel reticolo endoplasmatico durante la maturazione post-traslazionale delle proteine. Le proteine che vanno incontro a un ripiegamento non corretto sono rimosse e degradate dal sistema ubiquitina proteasoma 26S. Questa digestione delle proteine non propriamente ripiegate è un processo di controllo che avviene in tutte le cellule, ma può assumere anche risvolti patologici come nel caso della fibrosi cistica, condizione in cui una mutazione del canale del cloro CFTR altera il processo di ripiegamento della proteina favorendo la sua degradazione. Per questi motivi il sistema ERAD è stato considerato come un possibile bersaglio in nuovi approcci terapeutici per patologie umane.
- **Risposta immunitaria.** I peptidi generati dal proteasoma sono trasportati nel reticolo endoplasmatico dove si legano alle proteine MHC di classe I per essere ulteriormente sulla superficie cellulare (vedi Capitolo 45). L'inibizione del proteasoma blocca l'esposizione dei peptidi antigenici indicando che questi sono prodotti essenzialmente da questo sistema proteolitico.
- **Trasduzione del segnale.** Gli studi a questo riguardo hanno evidenziato che, accanto alla degradazione completa dei suoi substrati, il proteasoma può cata-

lizzare anche la proteolisi limitata di alcune proteine rilevanti nei processi di trasduzione del segnale, come ad esempio la p105, un precursore inattivo del fattore di trascrizione NF- κ B. Il proteasoma ne degrada solo la porzione carbossiterminale liberando la forma matura, denominata p50, che dimerizza con altre proteine citoplasmatiche (c-Rel, RelB e p65) formando diversi attivatori della trascrizione. Questi eterodimeri sono mantenuti in forma inattiva nel citoplasma dal legame con una proteina inibitrice, denominata I κ B α . Segnali generati durante processi infiammatori (come la stimolazione da TNF- α) stimolano l'ubiquitinazione e la degradazione parziale proteasomale della p105 e quella completa dell'I κ B α . La rimozione dell'I κ B α e la degradazione parziale di p105 a p50 consentono la traslocazione di NF- κ B nel nucleo necessaria per la sua funzione trascrizionale (vedi Capitolo 19).

- ▶ Sintesi proteica. Alcuni fattori di trascrizione, come i prodotti dei protooncogeni c-Fos e c-Jun, sono proteine con emivita estremamente breve che vengono degradati in seguito a ubiquitinazione.
- ▶ Sviluppo di tumori. L'ubiquitinazione e la degradazione della proteina p53, che si oppone allo sviluppo dei tumori favorendo l'apoptosi, vengono notevolmente stimolate dal legame con il peptide E6 del virus del papilloma umano (HPV), correlato con il carcinoma della cervice uterina.

La relazione tra proteine ubiquitinate e proteasoma, anche se prevalente, non è obbligatoria (vedi anche Approfondimento 25.4). Alcune proteine vengono infatti degradate dal proteasoma senza legarsi all'ubiquitina. L'esempio più caratteristico è fornito dall'ornitina decarbossilasi (ODC), l'enzima chiave nella sintesi delle poliammine.

Gli inibitori del proteasoma come farmaci antinfiammatori e antitumorali

Lo sviluppo di inibitori del proteasoma ha permesso dapprima di chiarirne le funzioni e i rapporti con gli altri sistemi proteolitici intracellulari e successivamente di realizzare nuovi approcci terapeutici. La lattacistina, un peptide isolato dagli actinomiceti, è il più specifico inibitore disponibile commercialmente del proteasoma (Tabella 25.4) e molto utilizzato sperimentalmente. Reagendo con i residui catalitici di treonina inibisce di circa il 90% la proteolisi intracellulare senza influenzare le proteasi lisosomiali.

Alla base dello sviluppo clinico dell'inibizione del proteasoma è la possibilità di contrastare la formazione della subunità p50 di NF- κ B. Tale strategia è potenzialmente importante per il trattamento non solo di processi infiammatori, ma anche di patologie neoplastiche. In questo caso si fa riferimento alla capacità antiapoptotica di NF- κ B che si realizza attraverso l'aumento dell'espressione di proteine, quali Bcl-2 e IAP, in grado di antagonizzare il realizzarsi dell'apoptosi. L'inibitore del proteasoma che si è rivelato più efficace clinicamente è il bortezomib (conosciuto anche come PS-341 o Velcade), un derivato dipeptidico dell'acido boronico. Questo composto inibisce reversibilmente

l'attività simil-chimotripsinica, e con essa l'intero processo catalitico del proteasoma, interagendo con il residuo catalitico di treonina. La specificità è legata alla capacità che il boro possiede di interagire con l'ossigeno ossidrilico della treonina, ma non con lo zolfo tiolico dei residui di cisteina presente ad esempio in diverse catepsine lisosomiali. In tal senso l'introduzione dei derivati peptidici dell'acido boronico, in precedenza sviluppati come inibitori delle proteasi seriniche, ha risolto i problemi di specificità presentati da aldeidi peptidiche quali MG132 (CBZ-leu-leu-leucinal) e MG 115 (CBZ-leu-leu-norvalinal).

Su queste basi è stato sviluppato il bortezomib che si è dimostrato clinicamente efficace nei confronti del mieloma multiplo, una patologia associata all'attivazione costitutiva di NF- κ B. Il successo terapeutico ne ha permesso l'approvazione rapidissima da parte degli organi di controllo statunitensi (FDA). Tuttavia nuovi inibitori sono stati introdotti nella sperimentazione clinica per superare i limiti del bortezomib rappresentati dalla scarsa efficacia contro i tumori solidi, la somministrazione per via endovenosa e la tossicità a carico del cuore e del sistema nervoso periferico. In questi nuovi inibitori, oltre a variazioni nello scheletro peptidico, il gruppo reattivo dell'acido boronico è stato sostituito da epossichetoni, aldeidi o vinil solfoni. Alcuni di questi composti, quali il PR-047 e l'MLN9078 entrati nella fase I della sperimentazione clinica, sono somministrabili per via orale e sembrano essere efficaci anche contro tumori solidi.

Il controllo di qualità delle proteine è svolto anche da altre proteasi seriniche

Per il controllo di qualità delle proteine all'azione del proteasoma e dell'autofagia si aggiunge l'attività della famiglia A di proteasi seriniche denominata HTRA (*High Temperature Requirement A*). Pur esprimendo un'attività similtripsinica, queste proteasi si differenziano per possedere una struttura più complessa nella quale il dominio catalitico è affiancato da uno o più domini PDZ (*Postsynaptic density of 95kDa, Discs large and Zonula occludens 1*) che non solo servono per l'interazione con altre proteine inclusi i substrati, ma anche modulano allostericamente la catalisi enzimatica. Un'altra caratteristica saliente delle HTRA è l'oligomerizzazione che, favorita dal legame con il substrato, si associa ad aumento dell'attività. Queste proteasi passano dunque da una forma monomerica ad alta attività legante per il substrato a una forma polimerica con maggiore capacità catalitica. Espresse anche nei batteri e nelle piante, nell'uomo se ne riconoscono 4 isoforme (HTRA 1-4) localizzate per l'80% in ambiente extracellulare dove l'azione sulle proteine della matrice extracellulare rende verosimile il coinvolgimento di queste proteasi nell'infiammazione e nelle malattie delle articolazioni.

Studi genetici hanno permesso di chiarire il ruolo delle HTRA come soppressori tumorali. Inoltre, soprattutto l'HTRA1 favorisce la proliferazione cellulare favorendo il rilascio dell'IGF (*Insulin Growth Factor*) e inattivando il TGF β (*Transforming Growth Factor β*). All'interno delle cellule è stata caratterizzata soprattutto la funzione dell'HTRA2 nel promuovere la rimozione autofagica dei mitocondri

alterati. La perdita dell'attività delle HTRA è stata messa in relazione con numerose malattie, quali artriti, cancro, degenerazione maculare, malattie di Alzheimer e di Parkinson. Tuttavia, al momento non sono chiari i rapporti con il proteasoma e l'autofagia nel controllare la degradazione proteica in questi processi patologici. Inoltre, la mancanza di inibitori specifici non ha ancora consentito gli approfondimenti clinici che nel caso del proteasoma sono stati resi possibili dal bortezomib e dai suoi derivati.

■ Caspasi: iniziatrici ed esecutrici dell'apoptosi

Le caspasi sono endopeptidasi sintetizzate in forma di proenzima inattivo da cui si ottiene per proteolisi un tetramero costituito da una coppia di eterodimeri a loro volta formati da una subunità con funzione catalitica e un'altra con funzione regolatrice (Figura 25.3). L'attività peptidasi richiede la presenza di entrambi i tipi di subunità che catalizzano esclusivamente reazioni di proteolisi limitate necessarie per l'attivazione di citochine, o coinvolte nella morte cellulare programmata, definita comunemente apoptosi. Inizialmente identificati come enzimi fondamentali nella maturazione proteolitica di alcune interleuchine (la caspasi 1 è anche nominata ICE, *Interleukin Converting Enzyme*), i membri di questa famiglia di cistein proteasi rivestono un ruolo rilevante in diverse tappe del processo di morte programmata o apoptosi (vedi Capitolo 27). Esse sono catalogate con numeri che in genere riflettono l'ordine con cui sono state scoperte. Le caspasi 1, 4 e 5 sono prevalentemente coinvolte nei processi di maturazione delle interleuchine e quindi rivestono un ruolo importante nei processi infiammatori e immunitari da queste mediate. Le caspasi 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10 sono invece coinvolte nei processi apoptotici. Esse esistono in forma di precursori inattivi che, come avviene nella cascata della coagulazione, vengono attivati da processi di proteolisi parziale che può essere effettuata dalle stesse caspasi. Si distingue pertanto un gruppo di caspasi prossimali o iniziatrici (2, 8 e 10) in grado di attivare le caspasi distali (3, 6, 7, 9 e 13) che "eseguono la condanna" (executioners) proteolizzando una serie di importanti proteine bersaglio. A differenza di quanto accade nella coagulazione, caratterizzata esclusivamente da un rapporto unidirezionale tra le varie proteasi, il processo a cascata delle caspasi presenta anche rapporti bidirezionali che hanno la funzione di amplificare il segnale iniziale. L'ordine gerarchico nella cascata proteolitica appare comunque chiarito solo per alcuni modelli sperimentali (stimolazione del recettore CD95), mentre in altri casi l'attività degli executioners non sembra richiedere una preventiva attivazione delle caspasi iniziatrici.

Le caspasi prossimali presentano una struttura più complessa di quelle distali. Poiché la loro attivazione avviene per autoproteolisi, è necessario uno stretto controllo che attivi l'intero processo solo in risposta a determinati segnali. In aggiunta al dominio catalitico, le caspasi prossimali sono infatti dotate di un ulteriore dominio (detto dominio effettore di morte o DED, *Death Effector Domain*) che le mette in relazione con particolari recettori. Il collegamento

non è diretto, ma avviene per interposizione di proteine adattatrici che interagiscono da un lato con i domini DED delle caspasi e dall'altro con "domini di morte" (DD, *Death Domains*) di proteine recettoriali di membrana, quali il CD95 o il TNF-R1. Il segnale generato dall'interazione tra tali recettori con i rispettivi ligandi porta alla formazione di un complesso sopramolecolare contenente adattatori e procaspasi. L'avvicinamento di un numero sempre maggiore di procaspasi crea le basi per l'autoattivazione proteolitica delle stesse e per la propagazione del segnale apoptotico dalla superficie all'interno della cellula. Il sistema è altresì dotato di sistemi di limitazione e autocontrollo in grado di ridurre la stimolazione delle caspasi prossimali. In questo gioco di equilibri, proteine quali FLIP (*FLice Inhibitor Protein*) e ARC (*Apoptosis Repressor with CARD, Caspase Recruitment Domain*) fungono da regolatori negativi interponendosi tra recettori ed enzimi e inibendo l'attivazione di questi ultimi.

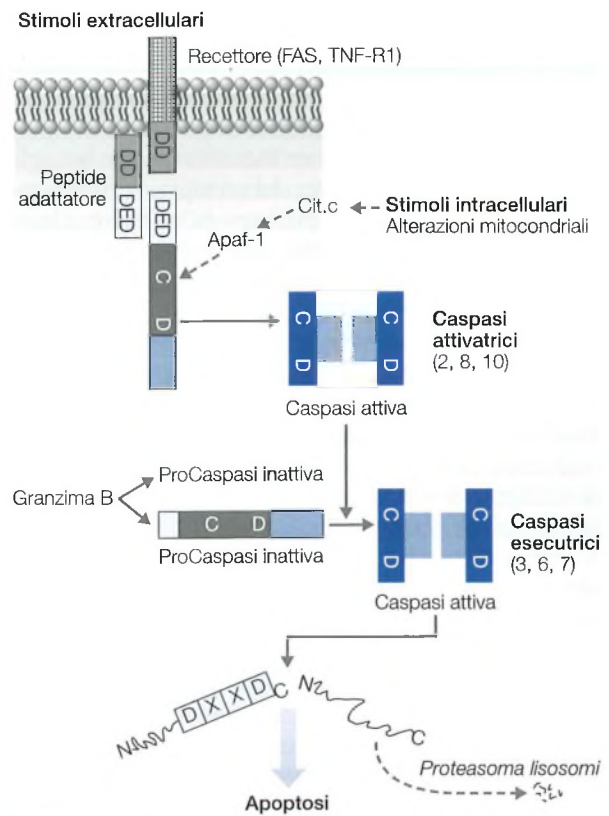


FIGURA 25.3 Cascata proteolitica delle caspasi coinvolta nell'apoptosi. Stimoli originati nell'ambiente extracellulare o intracellulare inducono l'attivazione per autoproteolisi di alcune caspasi, definite attivatrici perché in grado di proteolizzare, attivandoli, gli zimogeni di altre caspasi. Queste ultime sono definite esecutrici in quanto mettono in atto il programma di morte cellulare, proteolizzando in modo specifico proteine recanti la sequenza Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD). Le caspasi in forma attiva si presentano come tetrameri formati dall'associazione di due eterodimeri costituiti da una subunità più grande (C), contenente il residuo catalitico di cisteina, e una più piccola (D) con funzioni di regolazione. DD: dominio legato alla morte cellulare (*Death Domain*); DED: dominio che realizza la morte cellulare (*Death Effector Domain*); Apaf: fattore di attivazione dell'apoptosi; Cit. c: citocromo c.

Anche la procaspasi 9, seppure priva del DED, sembra sia attivata per autoproteolisi stimolata dall'aggregazione con l'Apaf-1 (*Apoptosis activating factor-1*), a sua volta conseguente al legame tra quest'ultimo e il citocromo c. Questo complesso denominato apoptosoma, particolarmente efficiente nel determinare l'apoptosi, sarebbe generato direttamente all'interno della cellula in risposta a stimoli in grado di modificare la funzione o la struttura dei mitocondri. La caspasi 9, che può comportarsi anche da caspasi distale, attiverebbe la procaspasi 3 in un processo inibito dal Bcl-2. Questo inibitore è localizzato soprattutto nella membrana esterna mitocondriale e la sua iperproduzione sembra impedire l'efflusso del citocromo c nel citoplasma. Le modalità di inibizione del Bcl-2, così come la partecipazione dei mitocondri all'apoptosi restano ancora da definire.

La proteolisi degli zimogeni delle caspasi può anche essere catalizzata aspecificamente da proteinasi lisosomiali o virali. L'attivazione caspasi può quindi divenire un processo massivo e incontrollato. Un esempio particolare a tale riguardo è rappresentato dal granzima B, una proteasi serinica introdotta nelle cellule bersaglio dai linfociti T citotossici che attivando alcune caspasi (ma non l'ICE) si pone come iniziatore della cascata caspasi.

Numerose proteine sono state identificate come bersagli specifici delle caspasi distali. Ad esempio, la frammentazione del DNA sarebbe prodotta da un'endonucleasi traslocata all'interno del nucleo solo in seguito al distacco da una proteina citosolica, denominata DFF (*DNA Fragmentation Factor*), substrato della caspasi 3. Le alterazioni morfologiche e la formazione dei corpi apoptotici sarebbero invece riconducibili alla degradazione rispettivamente di una proteina del citoscheletro, la gelsolina, e della PAK2 (*P21-Activated Kinase-2*). La reale gerarchia degli eventi che, partendo dall'attivazione delle caspasi, si traduce in morte apoptotica non è però stata chiarita nel suo complesso e nella sua varietà.

All'azione caspasi possono aggiungersi, amplificando il segnale iniziale altre proteasi. Ad esempio la calpaina è in grado di indurre l'attivazione per proteolisi di alcune caspasi che, a loro volta, proteolizzando la calpastatina possono rendere la calpaina più attiva. Inoltre, l'attivazione delle caspasi distali (9 e 3), generalmente a valle delle alterazioni mitocondriali, può essere il risultato di eventi tra loro diversi che attraverso l'attivazione delle caspasi prossimali (da citochine), o del rilascio di catepsine dai lisosomi (ad esempio, da stress ossidativo), o ancora della calpaina (in risposta all'aumento di Ca^{2+}) porta alla frammentazione della proteina proapoptotica Bid in grado di provocare il rilascio del citocromo c dai mitocondri (Figura 25.4). Appare così giustificato il titolo di una rassegna sull'argomento che definiva l'apoptosi come la morte da mille tagli.

■ Modulazione farmacologica delle caspasi

L'attività delle caspasi è inibita da diversi peptidi. Nelle cellule di mammifero si riscontra lo XIAP (*X-chromosome-linked IAP gene product*), membro della famiglia degli IAPs (inhibitor of apoptosis), che impedisce la corretta

maturazione delle procaspasi 3 e 7. Una sua mutazione è correlata all'insorgere dell'atrofia muscolare spinale. Di origine esclusivamente virale è invece il CrmA (*Cytokine response modifier A*), una serpina del virus vaccino che inibisce soprattutto le caspasi 1 e 8, mentre tutte le caspasi sono inibite in vario grado dalla proteina p35 codificata dal baculo virus.

L'inibizione farmacologica è ottenuta mediante la duplice interazione con il residuo catalitico di cisteina e il sito di legame del substrato che riconosce specificamente l'aspartico. Un tetrapeptide che riproduca la sequenza P_1-P_4 è sufficiente per creare un analogo del substrato in grado di legarsi all'enzima. La specificità per i diversi tipi di caspasi è fornita dal residuo in P_4 . In tale posizione la caspasi 3 riconosce un ulteriore residuo di aspartico, mentre la subfamiglia della caspasi 1 riconosce un residuo idrofobico. Utilizzando come stampo la sequenza di taglio YVAD contenuta nella prointerleuchina- 1β è stata sintetizzata l'aldeide tetrapeptidica Ac-YVAD-CHO che inibisce la ICE ($K_i < 1$ nM) con una selettività spiccata rispetto alla caspasi 3 ($K_i > 10$ μ M). Viceversa la sequenza di taglio contenuta nella poliADP-ribosio polimerasi, un bersaglio specifico della caspasi 3, è stata utilizzata per sintetizzare l'Ac-DEVD-CHO che inibisce specificamente la caspasi 3. Aldeidi, chetoni o nitrili peptidici si comportano da inibitori reversibili, mentre l'inibizione irreversibile è ottenuta mediante gruppi (acilossi)metilchetoni (Tabella 25.4). Più di recente sono stati sviluppati inibitori non peptidici, le isatine, che tuttavia non hanno mostrato in situ la stessa efficacia riportata dagli studi in vitro.

L'inibizione delle caspasi coinvolte nell'apoptosi è ancora lontana da un'applicazione clinica. Allo stadio attuale potrebbe essere utilizzabile acutamente per limitare i danni prodotti da processi ischemici. Una terapia cronica antiapoptotica necessita invece di un preciso indirizzamento dell'inibitore alle cellule da colpire per salvaguardare il regolare svolgersi dell'apoptosi nei tessuti sani. Lo stesso genere di problema limita anche lo sviluppo di farmaci capaci di stimolare le caspasi e i processi apoptotici che, data la stretta relazione esistente tra apoptosi e trasformazione neoplastica, troverebbero un importante campo di applicazione in oncologia. Di contro la sintesi di inibitori dell'ICE appare promettente per lo sviluppo di una nuova classe di farmaci antinfiammatori. In particolare un'aldeide non peptidica, il pralnacasan, è stato utilizzato, anche se non con risultati di particolare rilievo, in uno studio clinico di fase IIa per il trattamento dell'artrite reumatoide. Tuttavia (novembre 2003) è stato ritirato per il riscontro di tossicità epatica nell'animale da esperimento.

■ Calpaina è una cisteina endopeptidasi attivata dal Ca^{2+} in ambiente neutro ed è essenziale nel controllo di molti processi fisiologici e patologici

Il nome calpaina deriva dalla fusione tra le parole *calcio* e *papaina* per indicare l'assoluta dipendenza della proteasi dagli ioni Ca^{2+} e la sua natura di cisteina proteasi (la papaina è considerata uno dei capostipiti di questa classe di enzimi). Sono state identificate sei forme diverse

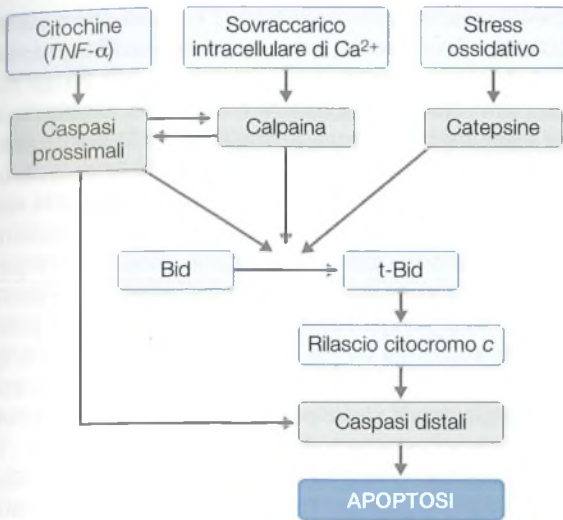


FIGURA 25.4 Relazioni tra i diversi sistemi proteolitici coinvolti nell'apoptosi. L'attivazione delle caspasi prossimali, in risposta a stimoli originati nell'ambiente extracellulare, o l'attivazione della calpaina e quella delle proteasi lisosomiali, in risposta a modificazioni dell'ambiente intracellulare, convergono sul mitocondrio provocando il rilascio di diverse proteine proapoptotiche, tra le quali riveste un ruolo preminente il citocromo c. In questa fase i segnali iniziali possono essere amplificati da sinergie di attivazione che si stabiliscono ad esempio tra calpaina e caspasi come descritto nel testo. Nel citoplasma il citocromo c determina, amplificando ulteriormente i segnali iniziali, l'attivazione delle caspasi distali e con essa l'esecuzione della fase finale del programma di morte cellulare. Per quanto concerne le relazioni con le attività proteolitiche, assume un ruolo centrale la proteolisi della proteina Bid i cui frammenti sono in grado di legarsi ai mitocondri innescando, attraverso meccanismi ancora da chiarire, la risposta proapoptotica. Il coinvolgimento dei mitocondri viene descritto come via intrinseca. Alternativamente, nella via estrinseca le caspasi prossimali possono talora attivare direttamente le caspasi distali in assenza di alterazioni mitocondriali.

di calpaina suddivisibili in due gruppi in base alla loro presenza e distribuzione nei tessuti: calpaine ubiquitarie e calpaine tessuto-specifiche.

Esistono due forme di calpaine ubiquitarie, definite come μ -calpaina e m-calpaina. La μ -calpaina viene attivata da concentrazioni micromolari di Ca^{2+} , mentre la m-calpaina richiede livelli millimolari di catione; ciò suggerisce che l'attività forma μ sia regolata in condizioni fisiologiche. L'affinità in vivo di questi enzimi per il Ca^{2+} può essere aumentata da diversi fattori, tra cui la fosfatidilserina e il fosfatidilinositolo, il che suggerisce che l'enzima venga attivato a livello della membrana cellulare.

Le calpaine ubiquitarie sono eterodimeri costituiti da una subunità maggiore catalitica (80 kDa) e una minore regolatrice (30 kDa identica nelle due forme). Entrambe le subunità contengono quattro domini di legame per il Ca^{2+} , detti domini E-F o "a forma di mano", che sono strutturalmente analoghi al dominio di legame del calcio della calmodulina.

Lablazione del gene codificante per la subunità regolatrice che impedisce l'espressione di entrambi le isoforme ubiquitarie è letale nella fase embrionale. Viceversa l'assenza della sola forma μ produce unicamente alterazioni dell'aggregazione piastrinica in contrasto con numerosi studi che assegnano a questa proteasi un ruolo fisiologico di controllo del ciclo cellulare, oltre a svariati ruoli in processi patologici.

Le calpaine catalizzano in genere una proteolisi limitata, cioè idrolizzano uno o pochi legami peptidici della proteina bersaglio. Un esempio è dato dalla proteina chinasi C nella quale, mediante la rottura di un singolo legame peptidico, viene liberato il dominio catalitico in una forma enzimaticamente attiva. Il frammento attivo prodotto dalla calpaina esprime la massima attività catalitica in assenza dei cofattori (Ca^{2+} , fosfolipidi e diacilglicerolo) indispensabili invece per l'attivazione della forma nativa della chinasi (Figura 25.5).

Accanto alle due forme ubiquitarie, il clonaggio e il sequenziamento del DNA hanno permesso l'identificazione di altre forme tessuto-specifiche delle quali tuttavia non

sono ancora state isolate le proteine codificate. Ciononostante, alcuni di questi geni simil-calpainici (14 in tutto nei vertebrati) hanno destato notevole interesse biomedico. La mancanza del gene della calpaina 9 appare essere un fattore causale del cancro dello stomaco, il polimorfismo G/A dell'introne 3 della calpaina 10 è stato associato alla resistenza insulinica e al diabete di tipo 2, mentre l'assenza della calpaina 3a (conosciuta anche come p94) provoca la distrofia del cinto scapolare. La calpaina G, un complesso proteico costituito dall'associazione tra la calpaina 8 e la calpaina 9, è invece essenziale per la difesa della mucosa gastrica da stress indotti da alcol, farmaci antiinfiammatori e dall'*Helicobacter pylori*. Le calpaine degradano un gran numero di proteine, ma il significato fisiologico per molte di queste digestioni non è stato ancora definito; in effetti molti di questi bersagli sono stati identificati solamente in esperimenti in vitro, che non riflettono necessariamente i processi che avvengono in vivo.

Oltre che dall'autoproteolisi, le calpaine sono regolate in vivo anche dalla presenza di un inibitore specifico, intracellulare e ubiquitario, la calpastatina. Questa proteina blocca sia i processi di attivazione, sia quelli catalitici della calpaina, con un meccanismo di tipo competitivo non ancora definito. La calpastatina può essere espressa nelle cellule in diverse forme che possono andare incontro a modificazioni post-traduzionali, con il risultato di generare una molteplicità di calpastatine con proprietà e specificità inibitorie diverse.

La localizzazione citosolica delle calpaine e i meccanismi che ne controllano l'attivazione rendono verosimile anche un "ruolo patologico" di questi enzimi. In presenza di aumenti eccessivi e/o prolungati della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, i sistemi di controlli endogeni ed esogeni della calpaina potrebbero ridursi lasciando la proteasi libera di agire in modo indiscriminato su strutture intracellulari causando danni irreversibili. Si ritiene perciò che le calpaine partecipino attivamente ai processi di necrosi cellulare. Su questa base, i danni da ischemia cerebrale o miocardica costituiscono gli obiettivi

principali di terapie fondate sull'inibizione delle calpaine (Tabella 25.4). Sono stati sviluppati diversi inibitori che in generale interagiscono con il gruppo tiolico della cisteina nel sito catalitico. Sono stati altresì sintetizzati derivati dell'acido α -mercaptoacrilico in grado di inibire le calpaine interagendo con il dominio di legame per il Ca^{2+} . Il grado di specificità di questi composti è tuttavia ancora insufficiente e non permette di discriminare le diverse calpaine, o l'inibizione di queste da quella esercitata nei confronti del proteasoma o di altre proteasi cisteiniche.

Proteasi intracellulari esogene

Componenti provenienti dall'ambiente extracellulare possono modificare l'attività proteolitica endocellulare

Diversi virus posseggono fattori peptidici capaci di inibire l'attività proteolitica cellulare e che fanno parte integrante dei meccanismi necessari per la replicazione virale o il danneggiamento cellulare. In altri casi, questi stessi scopi possono essere raggiunti attraverso la strategia opposta, cioè l'introduzione nelle cellule di nuove proteasi, come nel caso dell'HIV, o delle tossine tetanica e botuliniche (vedi Capitolo 32). L'elevata patogenicità di questi agenti è da attribuire anche al fatto che le cellule infettate non sono in grado di controllare o limitare l'attività di queste proteasi. Un altro esempio di patogenicità legata a proteasi esogene è quello delle infezioni da protozoi. Nel caso della malaria, che causa circa 1 milione di decessi all'anno, differenti attività proteolitiche sono coinvolte in tutte le fasi del ciclo vitale del *Plasmodium*. Lo sviluppo del *Plasmodium falciparum* è totalmente bloccato dall'inibizione combinata di inibitori di cisteina e aspartico proteasi come E64 e pepstatina. Lo sviluppo di inibitori specifici è una via promettente nella terapia contro questa malattia.

HIV e gli inibitori della proteasi virali

La terapia basata sull'inibizione della proteasi dell'HIV-1 ha rappresentato un enorme successo nella terapia delle infezioni da HIV-1 (vedi Capitolo 46).

HIV-1 è un lentivirus estremamente variabile che fa parte della famiglia dei retrovirus, virus a singolo filamento di RNA. Mediante una trascrittasi inversa codificata dal virus, l'RNA retrovirale è trascritto nel DNA a doppia elica che viene incorporato nel genoma della cellula infettata. Le proteine strutturali del virus, tra cui quelle necessarie per il legame del virus con la membrana cellulare e la sua penetrazione, sono codificate dai geni *gag* ed *env*, mentre il gene *pol* codifica per gli enzimi della trascrizione e per una proteasi aspartica della famiglia delle retropepsine che di solito occupa l'estremità N-terminale nella poliproteina codificata da *pol*. La proteasi è necessaria non solo per la maturazione di tutte le poliproteine virali, ma sembra essenziale anche per la dimerizzazione dell'RNA e quindi per l'infettività di questi virus.

Alla maturazione del virione possono contribuire anche proteasi endogene. In particolare la glicoproteina gp160 da cui originano la gp120 e la gp41, inserite nella membrana a doppio strato che avvolge l'HIV-1, contiene la sequenza REKR che viene riconosciuta dalla furina. L'inibizione di questa proteasi rappresenta un'ulteriore possibilità nello sviluppo di farmaci contro l'HIV.

Un'efficace strategia anti-HIV ha oggi come bersaglio sia la trascrittasi inversa, inibita da analoghi di nucleosidi o nucleotidi (come l'AZT) o da composti non nucleosidici, sia la proteasi (Tabella 25.4). La combinazione delle due classi di inibitori della trascrittasi con gli inibitori della proteasi realizza quella che viene definita HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*). I 19 composti approvati a questo scopo possono essere combinati in oltre 3000 differenti regimi terapeutici.

L'inibizione della proteasi porta alla formazione di particelle virali immature non infettanti. Lo sviluppo degli inibitori della proteasi dell'HIV (saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, amprenavir e lopinavir) rappresenta uno degli esempi più avanzati di progettazione molecolare dei farmaci basato sulla conoscenza della struttura tridimensionale del bersaglio molecolare e del suo funzionamento.

Punto di partenza è stata la specificità di taglio. La proteasi scinde legami peptidici tra un residuo idrofobico e la

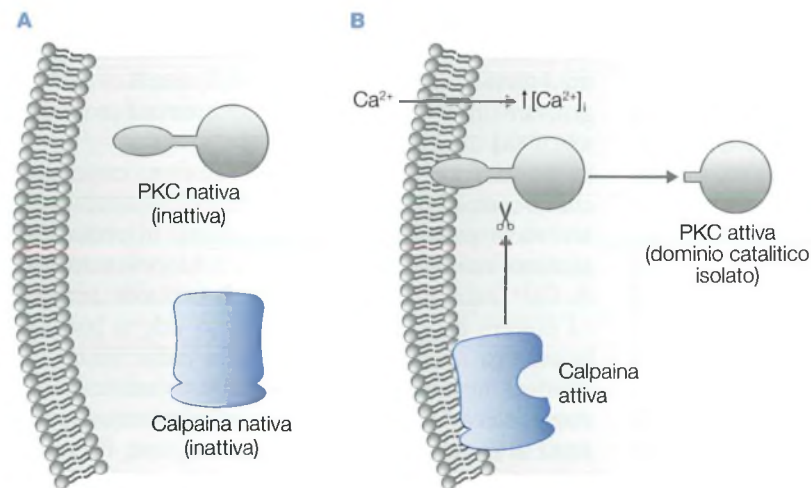


FIGURA 25.5 Esempio del possibile ruolo della calpaina nella trasmissione di segnali extracellulari all'interno di una cellula. **A.** In condizioni basali la calpaina e il suo bersaglio fisiologico PKC sono localizzati prevalentemente nella frazione solubile della cellula in forma inattiva. **B.** In seguito a stimolazione che porta a un aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , entrambi gli enzimi si associano alla membrana acquisendo una conformazione attiva. La calpaina attiva degrada quindi la PKC legata alla membrana liberando il dominio catalitico che diventa attivo in assenza di qualsiasi effettore, diventando capace di innescare una cascata di fosforilazione nella frazione solubile della cellula.

prolina, quando anche il residuo successivo sia idrofobico. In particolare il disegno degli inibitori si è basato sul dipeptide Phe-Pro situato alle posizioni 167 e 168 della poliproteina *gag-pol*. Poiché il taglio su una prolina in P₁ non è catalizzato da nessuna proteasi degli animali superiori, si sono dapprima creati peptidi nei quali la prolina era sostituita da un gruppo idrossietile che, mimando lo stato di transizione, potesse interagire con la coppia di aspartati catalitici. L'ulteriore sviluppo, che ha portato ai composti attualmente approvati per l'uso clinico, è stato caratterizzato dalla sostituzione di amminoacidi con gruppi in grado di adattarsi più accuratamente ai siti di legame. Nel saquinavir, ad esempio, la prolina è stata sostituita da un derivato chinolinico che interagisce con S₁ ed è legato con legame carboamidico con un residuo *t*-butilamidico che a sua volta occupa il sito S₃.

Purtroppo, l'elevato grado di mutazione dell'HIV-1 porta alla formazione di proteasi con conservata attività catalitica ma ridotta capacità di legame agli inibitori. Ad esempio una sostituzione valina-isoleucina nei lembi (sito S₁), pur mantenendo l'idrofobicità, riduce la superficie di contatto, mentre la sostituzione contraria può creare un ingombro sterico capace di impedire il legame.

Un importante limite alla terapia anti-HIV in generale, e all'uso degli inibitori della proteasi in particolare, è dato dalla loro tossicità che si esplica su diversi organi attraverso molteplici meccanismi. Le principali conseguenze sfavorevoli date dagli inibitori della proteasi sono:

ipercolesterolemia, lipodistrofia e resistenza insulinica. I primi due effetti avversi traggono origine dalla mancata proteolisi delle proteine leganti l'elemento di regolazione degli steroli (SREBP). Semplificando meccanismi di regolazione assai complessi che esulano da questa trattazione, le SREBP proteine in presenza di alti livelli di colesterolo intracellulare sono presenti in forma inattiva legate al reticolo endoplasmatico. Quando il livello di colesterolo si riduce, le SREBP vengono proteolizzate dapprima dalla S1P (la proteasi del sito 1), una subtilisina del reticolo, inibita dagli steroli e successivamente dalla S2P, una metallo proteasi unica nel suo genere in quanto localizzata nella membrana del reticolo. Tale proteasi è con ogni probabilità inibita dagli inibitori della proteasi dell'HIV. I frammenti così generati delle SREBP traslocando nel nucleo promuovono l'espressione sia degli enzimi che realizzano la sintesi del colesterolo e degli acidi grassi, sia dei recettori della plasma membrana necessari per portare all'interno delle cellule periferiche il colesterolo veicolato dalle lipoproteine. La mancata proteolisi delle SREBP altera la maturazione e la differenziazione degli adipociti (lipodistrofia), inibendone l'utilizzazione dei lipidi circolanti con conseguente elevazione della colesterolemia e della trigliceridemia. Per quanto concerne l'insulino-resistenza sembra ridotta la traslocazione sulla plasma membrana dei GLUT-4, i trasportatori del glucosio sotto controllo insulinico. Non è tuttavia noto quale sia il meccanismo responsabile della mancata traslocazione.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ La proteolisi intracellulare, che è responsabile del 75% del turnover delle proteine dell'organismo, è operata da quattro gruppi di proteasi differenziate in base al meccanismo catalitico.
- ▶ L'attività delle proteasi è finemente regolata da metaboliti, modifiche covalenti delle proteine substrato o da segregazione delle proteasi soprattutto all'interno dei lisosomi.
- ▶ La disregolazione delle attività proteolitiche intracellulari è direttamente responsabile di svariate malattie ed è indirettamente coinvolta in quasi tutte le patologie attraverso meccanismi implicati nella morte cellulare.
- ▶ Nell'uso clinico è disponibile un limitato numero di inibitori delle proteasi, a causa della limitata specificità delle molecole disponibili e degli effetti indesiderati generati dalla ridotta attività di enzimi comunque indispensabili per la vita cellulare.

Bibliografia essenziale

- ▶ Bedford Adams J. Proteasome inhibition: a novel approach to cancer therapy. *Trends Mol Med* 2002;8:S49-S54.
- ▶ Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. London: Academic Press, 1998.
- ▶ Chapman HA, Riese JR, Shi GP. Emerging role for cysteine proteases in human biology. *Ann Rev Physiol* 1997;59:63-8.
- ▶ Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann Rev Biochem* 1996;65:801-47.
- ▶ Dick LR, Fleming PE. Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy. *Drug Discov Today* 2010;15:243-9.
- ▶ Goll DE, Thompson VF, Li H et al. The calpain system. *Physiol Rev* 2003;83:731-801.
- ▶ Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010;40:280-93.
- ▶ Pomerantz RJ, Horn DL. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nature Med* 2003;9:867-73.
- ▶ Pontremoli S, Melloni E. Extralysosomal protein degradation. *Ann Rev Biochem* 1986;55:455-81.
- ▶ Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-6.

La proteolisi extracellulare

Francesco Blasi

Obiettivi formativi

- ▶ Richiamare l'importanza fisiologica delle proteasi extracellulari nella fibrinolisi, nella migrazione, nel differenziamento e nella crescita cellulare
- ▶ Conoscere la struttura molecolare dei sistemi plasminogeno/plasmina e delle metalloproteasi della matrice
- ▶ Capire come questi enzimi possano essere modulati attraverso i farmaci
- ▶ Comprendere il razionale per l'uso di questi farmaci nella patologia tumorale e cardiovascolare

È da tempo nota l'importanza delle proteasi extracellulari nei processi fisiologici e patologici; basti pensare alla coagulazione e al complemento caratterizzati dall'attivazione proteolitica a cascata di zimogeni che portano alla formazione della fibrina o di complessi multimerici ad attività litica e opsonizzante nel caso del complemento. Recentemente è anche emersa una funzione di trasduzione del segnale regolata da proteasi e loro recettori. Reazioni proteolitiche che hanno luogo nello spazio extracellulare sono importanti anche nella modulazione dell'attività di ormoni, neuropeptidi e altri ligandi recettoriali. Questo capitolo è dedicato all'analisi della proteolisi extracellulare, in particolare, ma non solo, all'attivazione del plasminogeno (PA) e delle metalloproteasi (MMP).

Sistemi di degradazione proteolitica della matrice extracellulare

La matrice extracellulare (ECM) è una complessa struttura di supporto (ma non passiva) per le cellule, composta da collagene, fibronectina, vitronectina, laminina, proteoglicani, fibrina e carboidrati complessi. Le relazioni tra ECM e cellule sono mediate da specifici sistemi multiproteici che assicurano l'ancoraggio cellulare alla matrice (vedi Capitolo 10) e la trasmissione di segnali modulatori per differenziazione, apoptosi, proliferazione e migrazione cellulare. Un sistema rapido, efficiente e spesso irreversibile per modificare tali interazioni è rappresentato dalla degradazione o dall'attivazione proteolitica di proteine della superficie cellulare o dell'ECM.

Plasminogeno e metalloproteasi sono zimogeni attivati per proteolisi controllata da attivatori specifici

Due sono i sistemi endopeptidasici maggiormente coinvolti nei processi di rimaneggiamento dell'ECM: il plasminogeno/plasmina con i suoi attivatori (PA) e le metalloproteasi della matrice (MMP). In entrambi i casi si tratta di veri e propri "sistemi" di proteine inattive (zimogeni), e non di singoli enzimi, che vengono attivati per proteolisi parziale. Nel caso del plasminogeno, l'attivazione a plasmina è controllata dal *tissue Plasminogen Activator* (tPA) e dall'urochinasasi (uPA). L'attivazione delle metalloproteasi è più complessa e richiede l'intervento delle stesse MMP e, in alcuni casi, della stessa plasmina. Alcuni enzimi hanno un'elevata selettività per i vari substrati (ad esempio tPA e uPA idrolizzano solo il plasminogeno in uno specifico legame peptidico). In altri, la selettività è scarsa (Tabella 26.1).

L'attività delle proteasi è regolata da inibitori selettivi

Le proteasi sono regolate da inibitori specifici, ad esempio i *Plasminogen Activator Inhibitors* (PAI-1 e -2) per i PA, l' α_2 -antiplasmina per la plasmina e i *Tissue Inhibitors of Metallo Proteases* (TIMP) per le MMP. Tutti gli inibitori riconoscono le proteasi corrispondenti in due punti: il sito attivo, e un sito accessorio (exosito) localizzato al di fuori del dominio proteasico.

L'attività proteasica è controllata nello spazio

Le cellule che producono gli inibitori sono generalmente diverse da quelle che producono gli enzimi. Qualche

TABELLA 26.1 Substrati delle endoproteasi extracellulari

Enzimi	Sinonimi	Substrati*
Metalloproteasi della matrice (MMP)	MMP-1, MMP-8	Collagenasi-1, 2
	MMP-13	Collagenasi-3
	MMP-2, MMP-9	Gelatinasi A e B
	MMP-7	Stromelisina-1
		Matrilisina
	MMP-11	Stromelisina-3
	MMP-12	Metalloelastase
MMP-14, 15	MT1-MMP MT2-MMP	
Attivatori del plasminogeno (PA) e altre endoproteasi	uPA	Urochinasi
	tPA	Attivatore tessutale
	Plasmina	
	Trombina	

AG: aggregano; α 1PI: α 1-Proteinase Inhibitor; α 2M: α 2-macroglobulina; BP: Binding Protein; Col: collagene; C: complemento; EL: elastina; EN: entactina; FB: fibrina/fibrinogeno; FN: fibronectina; GL: gelatine; HGF: fattore di crescita degli epatociti; LN: laminina; LP: Link Protein; MBP: proteina basica della mielina; PLG: plasminogeno; PG: proteoglicani; TN: tenascina; VN: vitronectina; gelatinasi A: 72 kDa gelatinasi; gelatinasi B: 92 kDa gelatinasi. * Non tutte le proteine in ciascun gruppo vengono proteoliticamente attaccate da tutti gli enzimi del gruppo

tessuto si organizza proteggendosi con una muraglia di cellule producenti inibitori che circondano le cellule che producono le proteasi. È interessante notare che nel corso di numerosi processi patologici l'aumentata espressione di proteasi è accompagnata da un parallelo aumento degli inibitori (vedi **CD**: Approfondimento 26.1. Attivatori del plasminogeno e malignità tumorale).

È quanto accade durante l'impianto embrionale nell'utero materno e in tutti i tipi di rimodellamento tissutale. Nello sviluppo di un tumore il fenomeno si riproduce per lo stretto rapporto tra cellule stromali e cellule cancerose. In tutti questi casi, la presenza degli inibitori (e quindi l'inibizione dell'attività proteolitica) non ha la finalità di bloccare il processo biologico (impianto dell'embrione, cancro, guarigione di una ferita ecc.), bensì quella di favorirne lo sviluppo regolandone l'intensità.

Un ultimo aspetto fondamentale comune è rappresentato dalla capacità di legare recettori di membrana o di essere direttamente componenti della membrana plasmatica. L'inibizione e la localizzazione membranaria delle proteasi extracellulari sono quindi parte integrante della funzione proteolitica tissutale e permettono di regolarne e modificarne non solo l'attività ma anche la localizzazione spaziale.

Il sistema del plasminogeno e i suoi attivatori

Il plasminogeno (Figura 26.1) è una molecola di circa 90 kDa, costituita da un dominio carbossiterminale che contiene la parte catalitica (proteasi) e da cinque domini kringle (K1-K5) posti al terminale amminico. Il kringle è una struttura compatta (di circa 90 amminoacidi con una disposizione specifica di tre ponti disolfuro) è dotato di alta affinità per i residui carbossiterminali di lisina presenti sia nella fibrina che in alcune proteine della superficie cellulare. Il plasminogeno è inattivo dal punto di vista proteolitico (zimogeno), e viene attivato dall'idrolisi

del legame peptidico tra arginina-560 e valina-561, a formare la plasmina, una serin proteasi estremamente attiva e ad ampio spettro. I substrati fisiologici della plasmina, oltre alla fibrina, sono soprattutto proteine della matrice extracellulare (fibronectina, laminina, vitronectina, proteoglicani). La plasmina ha una vita molto breve, in quanto nel sangue e nei tessuti è presente l' α_2 -antiplasmina che ne limita l'emivita nel sangue a pochi secondi.

Gli attivatori del plasminogeno sono utilizzati come fibrinolitici

L'attivazione plasminogeno dipende dagli attivatori del plasminogeno (PA), serin proteasi (uPA e tPA). Anche nei PA, la porzione catalitica è localizzata all'estremità carbossiterminale della molecola ed è preceduta da alcuni domini di regolazione che servono a legare cofattori o recettori specifici. L'attività enzimatica del tPA, relativamente bassa, viene fortemente stimolata dalla fibrina. In questo modo la produzione di plasmina viene concentrata proprio nella sede in cui la sua attività è richiesta, cioè dove è presente il coagulo di fibrina.

A differenza del tPA, l'uPA, mediante un territorio amminoterminale, lega uno specifico recettore presente sulla membrana cellulare (uPAR).

Queste caratteristiche sono alla base dell'utilizzazione del tPA (e di altri attivatori del plasminogeno come l'urochinasi, la streptochinasi e la stafilocochinasi) come farmaco trombolitico nei casi di ostruzione arteriosa causata da depositi di fibrina. Malgrado la mancanza di specificità per la fibrina, anche l'uPA è utilizzata in caso di ostruzioni vasali, anche se preferibilmente per quelle a carico delle vene (trombosi profonde). Un terzo attivatore del plasminogeno, la streptochinasi batterica, agisce con un meccanismo d'azione diverso formando con il plasminogeno un complesso stabile attivato per modificazione conformazionale. L'attivazione del plasminogeno è fondamentale nella degradazione dei depositi fibrinici e dipende da ambedue i PA come dimostrato dai fenotipi

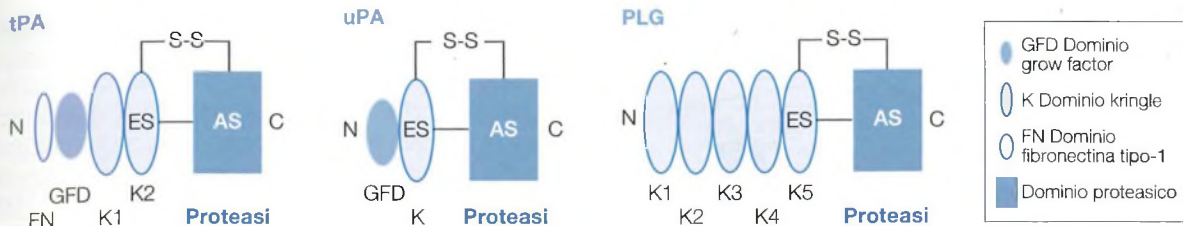


FIGURA 26.1 Organizzazione molecolare del plasminogeno e dei suoi attivatori. Il plasminogeno (PLG) e i suoi attivatori (PA) sono costituiti da motivi strutturali comuni. Essi vengono sintetizzati dalle cellule sotto forma di singola catena polipeptidica che, nel caso di uPA e PLG, è totalmente sprovvista di attività proteasica (zimogeni); tPA è invece dotato di attività enzimatica basale. L'attivazione di tutte e tre le proteine avviene per taglio proteolitico tra un dominio kringle e la regione proteasica. Le molecole sono disegnate dall'estremità amminoterminale (a sinistra) verso quella carbossiterminale (a destra). Al di sotto di ciascuno schema è indicata la natura dei vari domini strutturali. FN: dominio fibronectina tipo-1; GFD: *Growth Factor Domain*, dall'omologia con la sequenza del fattore di crescita epidermale (EGF); K1, K2 ecc.: dominio kringle, costituito da una catena proteica contenente tre ponti disolfuro interni. Proteasi: dominio di alta omologia con tripsina e altre serino proteasi contenente la regione ad attività proteasica; AS: sito attivo della proteasi a cui si legano substrato e inibitori; ES: "exosite", ovvero sito di legame degli inibitori esterni al dominio proteasico.

dei topi knockout (Tabella 26.2). Infatti, il fenotipo del topo mancante del plasminogeno (trombosi multiple in intestino, fegato, polmoni, cervello; ritardo nella guarigione delle ferite) viene riprodotto solo in mancanza di ambedue i geni (doppio ko per uPA e tPA). Al contrario, la mancanza di un singolo PA non produce grossi effetti fenotipici, perché la deficienza enzimatica è vicariata dall'attivatore del plasminogeno residuo.

L'attivazione localizzata dell'uPA è dovuta a interazione con un recettore di membrana

L'attivazione specifica dell'uPA (dal precursore inattivo pro-uPA; Figura 26.2) avviene a livello della superficie cellulare in quanto pro-uPA riconosce con alta affinità un recettore specifico che ne focalizza l'attività a livello della membrana cellulare. Il recettore dell'urochinas (uPAR) è una proteina associata alla membrana plasmatica con un'ancora glicolipidica. Pro-uPA legato al suo recettore è molto più accessibile ad altre proteasi, in particolare alla plasmina, che lo attivano per proteolisi parziale. uPAR induce anche l'internalizzazione e la degradazione dei

complessi inattivi PAI-1/uPA legati all'uPAR (ma non l'uPA libera). Il recettore dell'uPA è espresso costitutivamente da poche cellule, ma aumenta fortemente dopo l'induzione di un fenotipo migratorio fisiologico o patologico (ad esempio in monociti, macrofagi, linfociti T, cellule endoteliali, fibroblasti, cheratinociti durante il processo di guarigione delle ferite, cellule ematopoietiche staminali durante la loro mobilizzazione o cellule cancerose nel processo neoplastico). Fenotipi specifici della mancanza di uPAR sono la mancata migrazione cellulare in condizioni di stress (infezioni, cancro). Per un approfondimento su ruolo di uPAR nella migrazione cellulare, cancro e fisiologia delle cellule staminali (vedi CD: Approfondimento 26.3. uPAR, cancro e cellule staminali).

Funzioni e modulazione farmacologica del sistema degli attivatori del plasminogeno

Il sistema dei PA gioca un ruolo importante in fibrinolisi, migrazione, crescita e differenziamento cellulare

TABELLA 26.2 Fenotipi di topi resi geneticamente deficienti in uno o più geni del sistema dell'attivazione del plasminogeno*

Gene deleto	Deposizione di fibrina e trombosi ¹	Guarigione delle ferite ²	Risposta infiammatoria ³	Neo-angiogenesi ⁴	Metastasi ⁵
tPA	Assente	Normale	NT	NT	NT
uPA	Rara	Normale	Deficitaria	Normale	Ridotte
uPAR	Assente	NT	Deficitaria	NT	Ridotte
uPA/tPA	Frequente	Deficitaria	NT	NT	NT
PLG	Frequente	Deficitaria	NT	NT	Ridotte
uPAR/tPA	Frequente	NT	NT	NT	NT
PAI-1	Assente	Normale	NT	Assente	NT
PAI-2	Assente	Normale	NT	NT	NT

tPA: attivatore tissutale; uPA: urochinas; uPAR: recettore dell'urochinas; PLG: plasminogeno; PAI-1 e PAI-2: inibitori 1 e 2 degli attivatori del plasminogeno; NT: informazione non è ancora disponibile

* I fenotipi descritti nella tabella sono stati studiati mediante metodiche artificiali e quindi il risultato non ha valore generale e non può essere estrapolato al di là della specifica metodica. Ad esempio, il deficit nella risposta infiammatoria non si intende generalizzato, ma solo limitato alla specifica metodica utilizzata. ¹ La deposizione di fibrina è visibile praticamente in tutti gli organi; la trombosi più frequentemente nei vasi intestinali ed epatici. ² Questo parametro è misurato dalla velocità con cui i cheratinociti migrano dai bordi della ferita. ³ Misurata sulla base dell'esito dell'infezione polmonare causata mediante instillazione diretta di *Cryptococcus neoformans*. Misurata anche come presenza di cellule infiammatorie (macrofagi e linfociti) nella sede dell'infezione. ⁴ Reclutamento di cellule endoteliali da parte di cellule tumorali impiantate, e neoformazione vasale. L'assenza di neoformazione vasale impedisce la crescita tumorale. ⁵ Misurato dal numero di metastasi polmonari dopo introduzione sottocutanea di cellule tumorali.

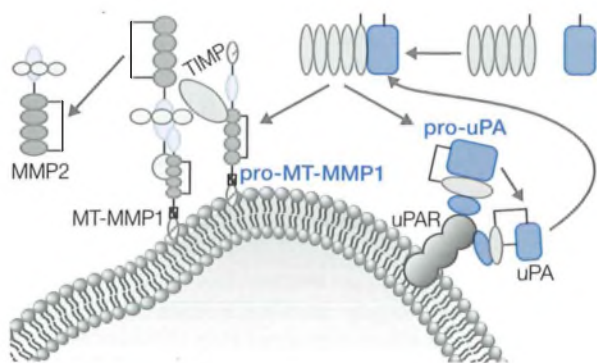


FIGURA 26.2 L'attivazione di pro-uPA e pro-MMP avviene a livello della superficie cellulare, ma con due meccanismi differenti. La pro-uPA legata al recettore (uPAR) viene proteoliticamente attaccata dalla plasmina e altre proteasi nel residuo 157, in una regione "linker" posta tra il kringle e il dominio proteasico. L'urochinasasi "matura" (uPA) è quindi formata da due catene polipeptidiche tenute insieme da un ponte disolfuro situato tra il linker e il sito proteasico. L'attivazione della pro-MMP2 richiede il taglio del propeptide a livello aminoterminale. Anche in questo caso l'attivazione avviene sulla membrana cellulare in quanto eseguita da MMP di membrana (MT-MMP). La pro-MT-MMP espressa sulla membrana plasmatica lega una molecola di inibitore TIMP-2 che a sua volta funge da "esca" per la pro-MMP2 costringendola a localizzarsi sulla membrana cellulare. La pro-MMP2 così reclutata viene attivata da una molecola di MT-MMP attiva adiacente che rimuove il propeptide. La rimozione del propeptide può avvenire in due tappe: la prima tappa può essere catalizzata da varie proteasi (inclusa la plasmina), mentre la seconda tappa è catalizzata specificamente da una metalloproteasi.

Attraverso la produzione di plasmina viene degradata la fibrina che si accumula a livello delle lesioni endoteliali riducendo o prevenendo la formazione di trombi, attività che viene sfruttata a scopi terapeutici in diverse patologie trombotiche, dall'infarto alle trombosi profonde (vedi **CD**: Approfondimento 26.2. Attivatori del plasminogeno e malattie cardiovascolari); all'esterno del letto vascolare l'uPA ha una funzione segnalatrice importante nella migrazione delle cellule. Inoltre, poiché la plasmina ha un ruolo importante nell'attivazione di pro-metalloproteasi e di precursori di fattori di crescita (ad esempio, il TGF- β , il β -FGF ecc.), l'effetto dei PA si fa sentire anche sulla regolazione della crescita e del differenziamento cellulare. Ad esempio, il topo uPA $^{-/-}$ è debilitato nei processi di migrazione cellulare con conseguente deficienza della risposta infiammatoria e immune (ipersensibilità alle infezioni), della migrazione delle cellule muscolari lisce della parete vasale (che impedisce l'ispessimento dell'intima e la ristenoasi dopo angioplastica), dei neuroni embrionali e della crescita e invasività di cellule cancerose (vedi **CD**: Approfondimento 26.3). Questa attività, riconducibile al legame a uPAR, non ha ancora raggiunto un interesse farmacologico.

Modulazione farmacologica del sistema del plasminogeno nei processi neoplastici

Mentre l'uso di tPA, uPA e analoghi funzionali è già esteso in patologie del sistema cardiovascolare, minore è l'espe-

rienza finora ottenuta con inibitori del sistema in malattie dovute a eccesso di migrazione cellulare, come il cancro. Malgrado l'omologia strutturale e la ridondanza funzionale tra uPA e tPA, è possibile trovare inibitori specifici di singole proteasi, come ad esempio l'amiloride, specifico dell'uPA. L'amiloride, ben conosciuta per la sua attività di diuretico risparmiatore di potassio (vedi Capitolo 16) rappresenta il punto di partenza per la ricerca di inibitori specifici per l'uPA che siano privi degli effetti diuretici e antipertensivi (ad esempio, WX71). Nella tabella 26.3 sono riportati alcuni farmaci inibitori dell'uPA attualmente in studio come farmaci antimetastatici.

Analoghi o frammenti di uPA, in grado di inibire l'attività catalitica, sono ora in fase di sperimentazione come farmaci anti-invasione neoplastica. (Tabella 26.3).

Le metalloproteasi della matrice

Le metalloproteasi della matrice (MMP) sono proteasi prodotte in forma di zimogeno attivabile da processi proteolitici. L'attività proteasica è legata a un sito catalitico altamente conservato, che contiene zinco (Figura 26.3). Alcune MMP sono relativamente selettive per il tipo di collagene che idrolizzano (ad esempio, MMP-2 e MMP-9 per il collagene di tipo IV), mentre altre hanno uno spettro di substrati più ampio che comprende anche altre proteine della matrice (come laminina, fibronectina), della superficie cellulare (selettine), recettori, fattori di crescita (Tabella 26.1).

Le metalloproteasi sono formate da moduli strutturali assortiti e sono riconosciute da specifici inibitori

Anche le MMP hanno una struttura modulare, in cui la parte catalitica è preceduta e seguita da specifici domini strutturali (Figura 26.3). Il dominio "emopexinico" media l'interazione con gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP) di cui per ora si conoscono quattro membri (TIMP-1, 2, 3 e 4), dotati di diversa specificità per le varie MMP. I TIMP (come i PAI) riconoscono anche il sito attivo catalitico della proteasi. Il sottogruppo MT-MMP presenta inoltre un territorio trans-membrana analogo a quello di molti recettori per fattori di crescita.

Come per i PAI, l'attività inibitoria dei TIMP non è esclusivamente finalizzata a impedire, bensì anche a regolare i processi biologici in cui sono coinvolte le varie MMP.

L'attivazione delle MMP è un processo multimolecolare che ha luogo sulla membrana cellulare

Le pro-MMP inattive sono attivate da un duplice taglio proteolitico nella regione N-terminale. Il primo può dipendere da una serin proteasi (ad esempio, plasmina), che rilascia un peptide N-terminale che rende la molecola di pro-MMP "adatta" all'attivazione. Nella seconda tappa, la sequenza di amminoacidi scoperta dal primo evento proteolitico viene attaccata da un'altra MMP, con conseguente rilascio di un secondo peptide ed esposizione del sito attivo. Come mostrato nell'esempio della figura 26.2, la seconda tappa dell'attivazione di pro-MMP2 avviene a livello della membrana cellulare. La sequenza di eventi

TABELLA 26.3 Attuali applicazioni farmacologiche delle proteasi extracellulari e prospettive per loro inibitori o antagonisti

Farmaco	Applicazioni	Effetto
Urochinas:	Trombosi venose profonde	Trombolitico
Pro-urochinas	Infarto del miocardio	Trombolitico
Attivatore tessutale (tPA)	Infarto del miocardio	Trombolitico
Varianti del tPA ¹	Infarto del miocardio	Trombolitico
Streptochinas	Infarto del miocardio	Trombolitico
Stafilocinas	Infarto del miocardio	Trombolitico
GFD di urochinas ²	Metastasi tumorali	Antagonista di uPAR
ATF di urochinas ³	Metastasi tumorali	Antagonista di uPAR
Angiostatina	Antitumorale	Apoptosi cellule endoteliali
Amiloride e derivati	Metastasi tumorali	Inibizione di uPA
Batimastat e derivati	Metastasi tumorali (sospeso)	Inibitore delle MMP
Galardina e derivati	Metastasi tumorali (sospeso)	Inibitore delle MMP

¹ Sono in fase di saggio clinico alcune varianti del tPA generate per via ricombinante, che hanno una maggiore affinità per la fibrina e minore sensibilità agli inibitori (PAI). ² GFD (*Growth Factor Domain*): frammento che include i 48 amminoacidi aminoterminali dell'urochinas. ³ ATF: frammento aminotermine dell'urochinas (residui 1-136).

prevede la cooperazione di due molecole di MT-MMP attive con l'inibitore TIMP-2. TIMP-2 è ancorato alla membrana attraverso il legame al sito attivo di una MT-MMP1 attiva (metalloproteasi con regione trans-membrana) e immobilizza la pro-MMP2 a livello del dominio emopechinico. La pro-MMP2 ancorata alla membrana plasmatica viene poi attivata da una molecola adiacente di MT-MMP1 attiva. Si genera così MMP2 attiva (gelatinasi A).

TIMP-2 ha quindi una duplice funzione nella regolazione dell'attività enzimatica delle proteasi bersaglio: a basse concentrazioni favorisce la loro localizzazione di superficie e quindi la loro attivazione, mentre ad alte concentrazioni inibisce la loro attività enzimatica. È quindi evidente la criticità del bilancio tra proteasi e inibitori e la relazione funzionale tra le due famiglie di proteasi, PA e MMP.

Funzioni e modulazione farmacologica delle metalloproteasi

Lo studio delle funzioni fisiologiche delle MMP è ostacolato dal gran numero di componenti della famiglia e dalla ridondanza funzionale. Ciononostante, la rimozione sperimentale nel topo dei singoli geni ha portato varie informazioni (Tabella 26.4). In particolare, è stata rilevata la ridondanza funzionale delle MMP per cui molti mutanti non presentano un fenotipo apparente (come nei casi della stromelina 3 o Str3/MMP11 e della MMP7) o solo modestamente alterato (come nel caso di MMP9 in cui si osserva ridotta angiogenesi a livello dell'impianto embrionale e riduzione della lunghezza delle ossa lunghe). I topi mutanti per una singola MMP sono inoltre utili nel chiarire il coinvolgimento di diverse proteasi nei processi neoplastici nei vari organi (ad esempio, cutanei per MMP9, del colon per MMP7 e della mammella per MMP11).

Come per i PA, l'espressione delle MMP e dei TIMP è fortemente aumentata in tutti i processi di rimodellamento tessutale e di migrazione nei processi infiammatori e neoplastici anche se la ridondanza di enzimi e inibitori rende difficile l'attribuzione di una funzione specifica a un particolare sistema MMP/TIMP.

Dati ulteriori sulla funzionalità delle MMP vengono dall'uso dei pochi inibitori sintetici disponibili. Ad esempio, la galardina, un inibitore non selettivo dell'attività collagenasica, inibisce fortemente la guarigione delle ferite mentre l'inibitore sintetico BB94 si è dimostrato efficace nella terapia dei tumori (Tabella 26.3) anche se l'ampiezza del suo spettro d'azione causa effetti tossici indesiderati. Il più efficiente di questi inibitori, il batimastat (Tabella 26.3), è un derivato dell'acido idrossamico (-CONHOH) che riconosce specificamente il sito attivo degli enzimi e lega reversibilmente l'atomo di zinco. Purtroppo la relativa mancanza di specificità nei confronti di MMP diverse causa una tossicità diffusa, per cui lo sviluppo del farmaco è stato sospeso. È in corso una ricerca attiva per trovare farmaci specifici per le MMP coinvolte più direttamente nei tumori o in altre malattie.

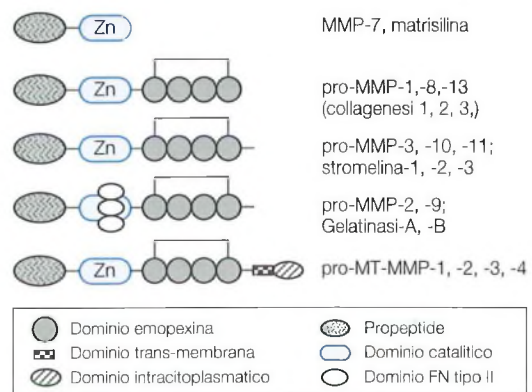


FIGURA 26.3 Struttura modulare delle metalloproteasi della matrice (MMP). Nella parte inferiore della figura sono schematizzati i simboli dei vari domini strutturali. La regione colorata in azzurro indica in ogni caso il dominio proteasico. Nel caso della pro-MMP2, 9 (gelatinasi A e B), il dominio catalitico contiene anche tre domini di fibronectina tipo-II. Tutte le proteasi sono indicate nella loro forma inattiva, contenente il propeptide all'estremità aminotermine. Il propeptide viene eliminato per via proteolitica durante l'attivazione (vedi Figura 26.2).

TABELLA 26.4 Ruolo in vivo delle MMP. Effetti della rimozione dei geni o della loro iperespressione

Gene		Fenotipo
Gene deleto ¹	MMP7	Assente
	MMP9	Riduzione lunghezza ossa lunghe
	MMP11	Assente
Gene iperespresso ²	MMP7 (colon)	Aumento velocità di progressione tumorale
	MMP9 (cute)	Idem
	MMP11 (mammella)	Idem

¹ La delezione dei vari geni è eseguita con tecniche di ricombinazione omologa su celle ES (*Embryonic Stem cells*) che dopo la modifica vengono ri-impiantate nella blastocisti di una topina pseudogravida. Attraverso incroci appropriati di topi contenenti uno solo dei due alleli modificato (eterozigote +/-), si arriva alla produzione di topi in cui ambedue gli alleli sono assenti (omozigoti -/-). ² La produzione di un topo iperesprimente un particolare gene si ottiene iniettando nell'ovocita un frammento di DNA contenente il gene di interesse fuso al promotore scelto. A seconda dei promotori, si può ottenere espressione in un particolare tessuto (come nel caso degli esempi riportati) oppure ubiquitaria.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Le proteasi extracellulari sono coinvolte nella attivazione proteolitica di zimogeni che portano alla formazione della fibrina e dell'attività litica del complemento.
- ▶ Esse inoltre modificano le relazioni tra matrice extracellulare e cellule modulando quindi la trasduzione di segnali importanti per il differenziamento, la proliferazione, la migrazione e l'apoptosi cellulare.
- ▶ Plasminogeno e metalloproteasi sono zimogeni attivati per proteolisi controllata da attivatori specifici.
- ▶ Gli attivatori del plasminogeno sono fondamentali per la degradazione dei depositi di fibrina e sono farmaci salvavita in molte patologie trombotiche, dall'infarto, all'ictus cerebrale, alle trombosi profonde.
- ▶ Le metalloproteasi sono attivate sulla membrana cellulare attraverso un processo multimolecolare.
- ▶ Le metalloproteasi sono coinvolte nella regolazione della localizzazione delle cellule in un tessuto, della mobilizzazione delle cellule nell'organismo e dei processi metastatici tumorali.
- ▶ Lo sviluppo di farmaci che controllano le metalloproteasi potrebbe essere di molto aiuto in questi processi dinamici.

Bibliografia essenziale

- ▶ Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator in cancer metastasis: a review. *Int J Canc* 1997;72:1-22.
- ▶ Blasi F. uPAR-uPA-PAI-1: a key intersection in proteolysis, adhesion and chemotaxis. *Immunol Today* 1997;18:415-7.
- ▶ Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nature Rev Mol Biol* 2002;3:932-43.
- ▶ Carmeliet P, Collen D. Targeted gene manipulation and transfer of the plasminogen and coagulation systems in mice. *Fibrinolysis* 1996;10:195-213.
- ▶ Chapman HA. Plasminogen activators, integrins, and the coordinated regulation of cell adhesion and migration. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:714-24.
- ▶ Collins R, Peto R, Baigent C, Sleight P. Aspirin, Heparin and Fibrinolytic Therapy in suspected Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 1997;336:847-9.
- ▶ Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:891-7.
- ▶ Shapiro SD. Mighty mice: transgenic technology "knocks out" questions of matrix metalloproteinase function. *Matrix Biol* 1997; 15:527-33.
- ▶ Skotnicki JS, Di Grandi MJ, Levin JI. Design strategies for the identification of MMP-13 and Tace inhibitors. *Curr Opin Drug Discovery Devel* 2003;6:742-59.
- ▶ Werb Z. ECM and Cell Surface Proteolysis: Regulating Cellular Ecology. *Cell* 1997;91:439-42.
- ▶ Wernert N. The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* 1997;430:433-43.

SEZIONE

8

Controllo del ciclo e proliferazione cellulare

CAPITOLO 27

Ciclo cellulare e morte cellulare

Angelo Spinedi, Orazio Cantoni, Francesco Autori, Mauro Piacentini

CAPITOLO 28

Meccanismo d'azione dei farmaci antitumorali

Giovanni Luca Beretta, Laura Gatti, Paola Perego

SEZIONE

9

Controllo del metabolismo cellulare

CAPITOLO 29

Il controllo farmacologico dello stress ossidativo e dei mitocondri
Orazio Cantoni, Clara De Palma, Fabio Di Lisa

CAPITOLO 30

Il controllo farmacologico della sintesi dei lipidi
Lorenzo Arnaboldi, Alberto Corsini, Nicola Ferri

CAPITOLO 31

Il controllo farmacologico del metabolismo glucidico
Paolo Moghetti, Giacomo Zoppi

9

Il controllo farmacologico dello stress ossidativo e dei mitocondri

CAPITOLO

29

Orazio Cantoni, Clara De Palma, Fabio Di Lisa

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le conoscenze di base sui meccanismi di danno cellulare causati dalle alterazioni mitocondriali, specialmente per quanto attiene allo stress ossidativo e all'omeostasi del Ca^{2+}
- ▶ Comprendere quali sono le principali conseguenze di una eccessiva formazione mitocondriale di ROS con lo scopo di adottare precise strategie farmacologiche che preservino il mitocondrio, la sua funzionalità e prevengano lo stress ossidativo
- ▶ Acquisire le conoscenze su possibili bersagli mitocondriali di composti e farmaci con particolare riferimento al poro della transizione della permeabilità mitocondriale

Struttura e organizzazione del mitocondrio

I mitocondri sono organelli intracellulari (con un diametro di 0,5-1 μm) in grado di muoversi nel citoplasma e sono spesso associati ai microtubuli, che ne determinano distribuzione e localizzazione nei differenti tipi cellulari. Nelle cellule eucariotiche, i mitocondri occupano una porzione variabile del volume citoplasmatico, che cresce con l'aumentare della dipendenza dal metabolismo ossidativo. Ad esempio, nei miociti cardiaci, le cellule del nostro organismo più ricche di mitocondri, il volume di questo organelli rappresenta circa un terzo dell'intera cellula. I mitocondri, inoltre, per adattarsi alle esigenze della cellula, hanno la possibilità di cambiare forma e funzione molto rapidamente.

Solo negli ultimi 15 anni, con l'avvento delle tecniche di *live-cell imaging*, si è potuta apprezzare la sorprendente natura dinamica dei mitocondri. La continua ricerca dei meccanismi di regolazione ha evidenziato come queste variazioni morfologiche siano indicative della funzione dell'organello e come governino la sua capacità di svolgere ruoli molteplici (vedi CD: Approfondimento 29.1. *Ruolo della dinamica mitocondriale nella fisiopatologia cellulare*).

Il mitocondrio è diviso in due compartimenti, matrice e spazio intermembrana, da due membrane altamente specializzate con differenti funzioni. La membrana mitocondriale esterna (*Outer Mitochondrial Membrane*, OMM) contiene molte copie di una proteina trasportatrice, chiamata porina, che forma ampi canali acquosi attraverso il doppio

strato fosfolipidico. Ioni e piccole molecole (fino a una massa di 5000 dalton) possono entrare con facilità nel mitocondrio attraverso questi canali, raggiungendo e accumulandosi nello spazio intermembrana; non tutte le molecole, tuttavia, possono attraversare la membrana mitocondriale interna (*Inner Mitochondrial Membrane*, IMM). Lo spazio intermembrana presenta, quindi, una composizione chimica equivalente a quella del citosol, mentre la matrice contiene una porzione ben selezionata di molecole proprio come conseguenza della selettiva permeabilità della IMM.

IMM e matrice sono le regioni veramente funzionali del mitocondrio. La IMM è costituita da un doppio strato fosfolipidico caratterizzato dalla ricchezza in cardiolipina e dall'assenza del colesterolo. Un'altra caratteristica saliente è rappresentata dall'abbondanza di proteine, superiore all'80% della composizione totale dell'IMM, mentre nelle altre membrane cellulari, inclusa la OMM, è sempre inferiore al 50%. Tale abbondanza di proteine è giustificata non solo dalla funzione di conversione energetica e sintesi di ATP, ma anche dagli scambi di metaboliti attraverso la IMM. Prova ne sia che la adenina nucleotidica trasportasi (ANT), responsabile dei movimenti bidirezionali di ATP e ADP, costituisce da sola il 10% di tutte le proteine della IMM.

La IMM è ripiegata a formare numerose pieghe, denominate *cristae*, che ne aumentano notevolmente la superficie e rendono più efficiente la produzione di ATP. Il numero di *cristae* varia a seconda del tipo cellulare. Nei cardiomiociti, ad esempio, il loro numero è tre volte maggiore

che negli epatociti, presumibilmente per la grande richiesta di energia propria delle cellule cardiache.

La matrice mitocondriale contiene tutti gli enzimi deputati al catabolismo del piruvato e degli acidi grassi e tutti gli enzimi del ciclo dell'acido citrico che ossidano l'acetilCoA per generare equivalenti riducenti per la catena respiratoria. Dispersi al suo interno si trovano anche ribosomi, tRNA e varie copie (da 2 a 10) del DNA mitocondriale (mtDNA). I mitocondri possiedono infatti un proprio genoma e tutto ciò che è necessario per la sua trascrizione e traduzione. Il mtDNA possiede 37 geni, di cui 13 codificano per subunità dei complessi I, III, IV e V della catena respiratoria, gli altri corrispondono a tRNA e rRNA; l'unico complesso completamente di origine nucleare è il CII.

La IMM e la matrice sono dunque la sede di tutte le reazioni biochimiche del mitocondrio che dall'ossidazione dei nutrienti generano CO_2 , H_2O e ATP.

Al di là del ruolo vitale svolto nell'ossidazione dei substrati e nella sintesi dell'ATP, per le quali si rimanda ai manuali di biochimica, ai mitocondri vengono attribuite molteplici funzioni. Regolano infatti la loro stessa biosintesi, l'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} e la sintesi di numerosi composti; gli studi più recenti ne mostrano inoltre il coinvolgimento nell'autofagia (vedi Capitolo 25) e nella risposta immunitaria innata. Accanto ai molteplici ruoli nella fisiologia cellulare, i mitocondri, pur se può apparire paradossale, rivestono un ruolo centrale in svariate patologie, perché intervengono nella regolazione della morte cellulare di tipo necrotico e/o apoptotico. Tali processi prendono origine dalla disfunzione mitocondriale indotta da molteplici cause, quali alterazioni metaboliche, esposizione a composti tossici, ridotta ossigenazione cellulare, trasduzione di messaggi originati nel citoplasma che mirano alla soppressione della cellula. Nella maggior parte di questi processi, tra loro assai differenti, è tuttavia possibile riconoscere come elemento comune l'instaurarsi di un circolo vizioso tra accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e aumento dei livelli intracellulari e intramitocondriali di Ca^{2+} . Entrambi questi elementi sinergizzano nel causare l'apertura del poro della transizione della permeabilità mitocondriale (PTP), da molti considerato, in particolare a livello cardiaco (ma non solo), come la via finale e comune che determina l'irreversibilità del danno cellulare. Oltre all'indubbio interesse biologico, questi processi mitocondriali rappresentano rilevanti bersagli terapeutici, che nel caso del PTP hanno acquisito validazione clinica nella terapia contro l'infarto del miocardio.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS)

I radicali dell'ossigeno come il superossido (O_2^-) e il radicale ossidrilico (OH^\cdot) sono specie dotate di elevata reattività chimica in quanto, contenendo elettroni spaiati, tendono a reagire rapidamente con diverse molecole, in particolare (ma non solo) lipidi, acidi nucleici e proteine. La loro formazione mitocondriale, o in distretti diver-

si, si traduce pertanto nell'induzione di estese lesioni alle biomolecole che giustifica il ruolo critico di detti radicali in molteplici patologie. Questo concetto, nella sua logicità, ha avuto il torto di rallentare fortemente lo sviluppo delle conoscenze sull'impatto fisiopatologico dei radicali dell'ossigeno nei sistemi biologici. La ricerca degli ultimi due decenni ha infatti ostinatamente limitato la sua attenzione alla caratterizzazione delle lesioni che essi producono, cercando eventualmente l'associazione con specifici eventi patologici. Si è così creata molta confusione. L'ampio spettro delle lesioni che emergeva e la crescente sottolineatura di un potenziale impatto in tutte le patologie hanno portato al consolidamento di un concetto che si è rivelato non corretto e cioè che i radicali dell'ossigeno sono sempre e comunque specie tossiche, perché in grado di danneggiare virtualmente tutte le biomolecole. Di qui la semplificazione che ancora oggi fornisce la base "culturale" per pratiche terapeutiche "universali" che, attraverso la somministrazione di molecole antiossidanti, rappresenterebbero la panacea per tutte le patologie.

L'equazione elevata reattività = effetto non selettivo viene ora considerata corretta limitatamente a un contesto chimico, mentre da anni si è preso atto del fatto che i radicali dell'ossigeno sono coinvolti nella regolazione di molte funzioni fisiologiche e che possano quindi rivestire il ruolo di molecole segnale. Questa considerazione, ovviamente, non cancella il ruolo patologico dei radicali dell'ossigeno, ma ne delimita i confini permettendo una migliore definizione dei meccanismi e l'identificazione del loro ruolo nelle specifiche patologie.

È infine opportuno ricordare che mentre i radicali dell'ossigeno sono classificabili come ROS, esistono altre molecole, come il perossido di idrogeno (H_2O_2), che spesso viene identificato come ROS, ma che tuttavia non è un radicale in quanto privo di elettroni spaiati.

Formazione mitocondriale delle specie reattive dell'ossigeno

È oggi comunemente accettato che, all'interno della maggior parte delle cellule, la frazione più rilevante delle ROS sia prodotta dai mitocondri. In questi organelli diverse reazioni portano alla riduzione parziale dell'ossigeno in equilibrio con molteplici sistemi adibiti alla rimozione di queste specie potenzialmente tossiche.

I sistemi più caratterizzati per la formazione mitocondriale delle ROS sono la catena di trasporto degli elettroni (o catena respiratoria), le monoaminossidasi (MAO) e la p66^{Shc} . Tuttavia sono lunghi dall'essere chiariti i rapporti che intercorrono tra questi sistemi, i meccanismi che portano alla loro attivazione in condizioni patologiche e i legami con gli altri sistemi intracellulari, specialmente la NADPH ossidasi, che concorrono alla formazione delle ROS.

La catena respiratoria

Per lungo tempo si è ritenuto che una quota importante, compresa tra il 2 e il 5%, dell'ossigeno consumato dalle

cellule del nostro organismo sia riconducibile alla formazione di O_2^- nella catena respiratoria mitocondriale, in particolare a livello del ciclo Q del complesso III (circa il 70%), in minore parte nel complesso I (Figura 29.1). La sovrastima è evidente, ma anche l'ipotesi più realistica di uno 0,1% comporterebbe comunque la formazione di elevati livelli di questo radicale. Appare altrettanto ovvio che detta percentuale sia solamente indicativa, in quanto numerosi sono i fattori che possono modificare, anche in modo sostanziale, la quantità di O_2^- prodotto. Tra questi sono di particolare importanza il tipo cellulare, lo stato respiratorio ed eventuali alterazioni funzionali della catena respiratoria. Come sarà successivamente discusso, questi radicali possono anche esercitare un ruolo di molecole segnale, suggerendo pertanto un ulteriore livello di controllo della loro formazione. In altre parole, è molto probabile che la prima riduzione dell' O_2 , e relativa formazione di O_2^- , non sia necessariamente la conseguenza dell'inefficienza del trasporto degli elettroni nella catena respiratoria, ma rappresenti piuttosto, quantomeno in un contesto squisitamente fisiologico, lo strumento di un sofisticato meccanismo di controllo di vie di segnalazione. La maggior parte delle ROS mitocondriali, come già detto, si forma a livello del complesso III, che accetta gli elettroni donati al coenzima Q dai complessi I e II trasferendoli al citocromo c. In queste condizioni, il coenzima Q ridotto (QH_2), perdendo un elettrone si trasforma in radicale ubisemichinone ($QH\cdot$) che eventualmente (ovvero attraverso il passaggio in altri citocromi) dona il secondo elettrone per la riduzione dell'ubichinone. Ovviamente sono necessari due cicli per la riduzione completa del coenzima Q. Il radicale ubisemichinone, tuttavia, può trasferire direttamente elettroni anche all'ossigeno molecolare, un evento favorito dall'ubiquitaria presenza di quest'ultimo, da particolari sostanze chimiche e condizioni quali l'ipossia e, inaspettatamente, anche l'ipossia. Il complesso I libera O_2^- nella matrice mentre il complesso III libera tali specie in entrambi i lati della membrana mitocondriale interna, facilitando in questo

modo il raggiungimento di bersagli citosolici. In effetti l' O_2^- sarebbe in grado di attraversare la membrana mitocondriale esterna, ma solo nella sua forma protonata, scarsamente rappresentata a pH fisiologico. Inoltre, la natura radicalica dell' O_2^- , pur non associata a una reattività particolarmente elevata, impone interazioni con altre biomolecole, ad esempio l'aconitasi, la cui attività viene in questo modo inibita. L'aconitasi è un bersaglio così sensibile all'azione dell' O_2^- che la sua inibizione viene considerata come un marker attendibile della formazione di questo radicale.

Un'importantissima interazione dell' O_2^- è quella con il monossido di azoto (NO), con conseguente formazione di una specie dell'azoto molto reattiva, e tossica, il perossinitrito. In questo senso appare chiaro il ruolo difensivo svolto dall'isoforma mitocondriale dell'enzima superossido dismutasi (MnSOD), che converte l' O_2^- in H_2O_2 . Quest'ultimo non è particolarmente reattivo (perlomeno in assenza di ferro bivalente, o di altri metalli che possono catalizzare la reazione di Fenton, vedi oltre). La competizione della MnSOD con l'NO assume quindi un ruolo di importanza primaria dal momento che l'NO è un gas lipofilo e può quindi facilmente raggiungere il compartimento mitocondriale. È inoltre possibile che il gas venga direttamente prodotto nei mitocondri da una NO sintasi mitocondriale. In entrambi i casi, bassi livelli di NO possono favorire la formazione mitocondriale di O_2^- per interferenza con il trasporto degli elettroni nella catena respiratoria mentre più alti livelli di fatto ne comportano una rapida eliminazione per formazione di perossinitrito (vedi anche Capitolo 43).

Le monoaminossidasi

Le MAO sono flavoenzimi localizzati a livello della membrana mitocondriale esterna (Figura 29.1), responsabili della deaminazione ossidativa di neurotrasmettitori e ammine assunte con la dieta (vedi anche Capitoli 33 e 35 per le implicazioni nella degradazione di alcuni neurotrasmettitori). Se ne possono individuare due isoforme,

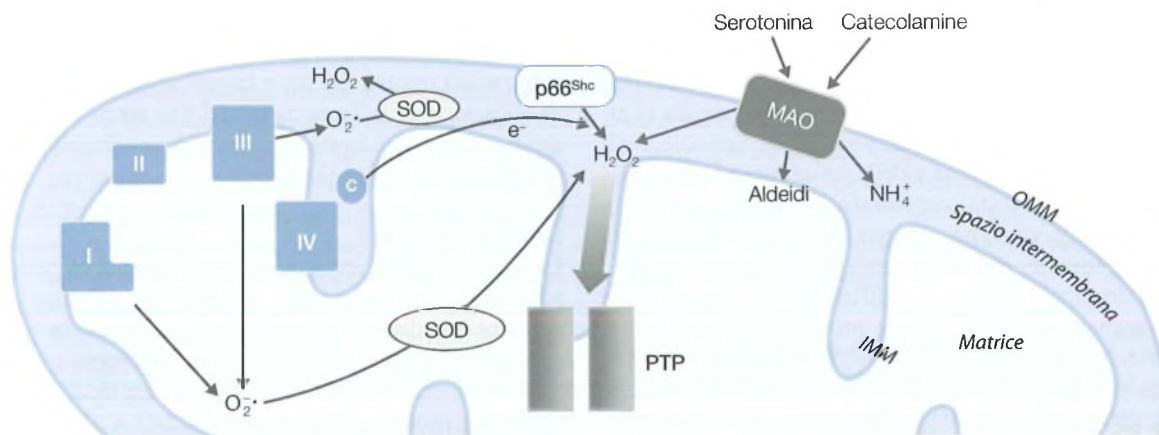


FIGURA 29.1 Rappresentazione schematica della formazione mitocondriale delle ROS. I mitocondri rappresentano il sito più importante per la formazione intracellulare delle ROS. I sistemi coinvolti sono la catena respiratoria, le monoaminossidasi e P66^{Shc}. C: citocromo c; PTP: poro della permeabilità mitocondriale; SOD: superossido dismutasi.

MAO-A e MAO-B, distinguibili per differente affinità di substrato e inibizione farmacologica.

La MAO-A catalizza preferenzialmente la deaminazione ossidativa della norepinefrina (NE) e della serotonina (5-HT) ed è inibita da basse concentrazioni di clorgilina. La MAO-B presenta maggiore affinità per la feniletillamina e benzilamina ed è inibita dalla selegilina. Entrambe catalizzano la deaminazione di dopamina, tiramina, triptamina, octopamina e sono inibite dalla pargilina.

Oltre a formare l'aldeide corrispondente al substrato aminico, la reazione genera H_2O_2 e ammoniaca. Tutti e tre questi prodotti sono potenzialmente dannosi per i mitocondri, dove vengono generati. È anche ipotizzabile un effetto di sommazione tra i meccanismi di danno.

L'intermedio aldeidico è rapidamente metabolizzato nel corrispondente acido per effetto dell'aldeide deidrogenasi (ALDH). Una disfunzione a carico di questo ultimo enzima potrebbe incrementare gli effetti deleteri dell'attività MAO, attraverso la mancata eliminazione di intermedi aldeidici potenzialmente tossici. D'altro canto l'ammoniaca, elevando il pH nella matrice mitocondriale, potrebbe favorire l'apertura del PTP. Tuttavia, il maggiore interesse si è incentrato sulla formazione di H_2O_2 , ponendo l'inibizione delle MAO come una valida difesa antiossidante. È importante sottolineare il fatto che la quantità di H_2O_2 generata dalle MAO mitocondriali è superiore a quella prodotta dalla catena respiratoria. In mitocondri isolati di cervello, infatti, il contributo della catena respiratoria è risultato 48 volte inferiore rispetto a quello attribuibile alla MAO.

Malgrado la loro ampia distribuzione in organi e tessuti umani e animali, il ruolo delle MAO è stato studiato prevalentemente a livello del sistema nervoso o nell'apparato gastroenterico. Sono infatti note le loro implicazioni in malattie psichiatriche, come la depressione, e in malattie neurodegenerative, quali tipicamente il morbo di Parkinson, in cui la perdita di neuroni dopaminergici nella sostanza nigra è stata correlata a un'incrementata ossidazione della dopamina a opera della MAO-B, con conseguente produzione di ROS responsabili del danno ossidativo a livello dei neuroni nigrostriatali. Anche nella malattia di Alzheimer e nella corea di Huntington si riscontra un'incrementata attività delle MAO-B cerebrali. Solo recentemente è aumentata l'attenzione rivolta all'attività della MAO a livello cardiovascolare, non solo per il metabolismo della 5-HT e delle catecolamine, ma anche e soprattutto in relazione allo stress ossidativo. Occorre infatti considerare che, accanto al ruolo patologico nella morte cellulare, che viene descritto più avanti, le ROS, essendo capaci di innescare differenti vie di trasduzione del segnale, possono indurre proliferazione cellulare e ipertrofia. Ad esempio, basse concentrazioni di 5-HT possono indurre ipertrofia a livello dei cardiomiociti, con meccanismo sia MAO-dipendente che recettoriale, a mezzo dell'attivazione dell'ERK1/2, una chinasi essenziale per la proliferazione cellulare. Infatti, in cellule della muscolatura liscia, la stimolazione del recettore 5-HT_{1B/D} induce la fosforilazione dell'ERK1/2, mentre

l' H_2O_2 prodotta dalla MAO determina la traslocazione della stessa chinasi nel nucleo.

Anche se basse concentrazioni di 5-HT promuovono proliferazione cellulare e ipertrofia, elevate concentrazioni portano al rilascio mitocondriale di citocromo c e all'apoptosi dei cardiomiociti. Questo effetto può essere direttamente attribuito all'attivazione della MAO-A, in quanto il suddetto processo è completamente prevenuto impiegando l'inibitore pargilina. Questo processo contribuisce al danno da riperfusione postischemica (vedi CD: Approfondimento 29.2. *Ruolo dei mitocondri nel danno ischemico del miocardio*) in quanto, in questa condizione, si verifica una elevata liberazione di 5-HT da parte delle piastrine attivate. Indipendentemente dalla disponibilità esogena di 5-HT, come si osserva nel cuore o nei cardiomiociti isolati, l'inibizione farmacologica della MAO-A o la sua delezione genetica sono in grado di ridurre sia l'aumento nella formazione delle ROS sia la morte cellulare causate da ischemia/riperfusione.

Il ruolo delle MAO nello stress ossidativo generato dai mitocondri è stato più di recente confermato in modelli di scompenso cardiaco e di distrofia muscolare. Infatti, l'inibizione farmacologica o genetica delle MAO antagonizza la transizione da ipertrofia a dilatazione e scompenso cardiaco determinato dalla costrizione dell'aorta toracica e riduce il quadro di degenerazione muscolare associato alla mancanza di distrofina o collagene VI. Queste evidenze sperimentali che pongono l'inibizione delle MAO come un'efficace strategia antiossidante attendono la validazione clinica. Occorre comunque osservare che, a differenza dei trattamenti antiossidanti comunemente proposti, che si basano sulla rimozione chimica delle ROS una volta prodotte, l'inibizione delle MAO consente di prevenire la loro formazione attraverso un'azione specifica che tra l'altro impedisce anche la generazione di altre molecole potenzialmente tossiche, quali aldeidi e ammoniaca. Inoltre, con l'esclusione della xantina ossidasi, che tuttavia non sembra contribuire allo stress ossidativo miocardico nell'uomo, le MAO appaiono essere l'unico sistema coinvolto nella formazione delle ROS suscettibile di modulazione farmacologica. Non sono infatti disponibili inibitori specifici delle NADPH ossidasi, non si conoscono inibitori della p66^{Shc} e, per quanto concerne la catena respiratoria, risulta del tutto improbabile un intervento di inibizione della formazione del $O_2^{\cdot-}$ senza interferire con funzioni vitali legate alla conversione energetica nella membrana mitocondriale interna.

La proteina p66^{Shc}

La proteina p66^{Shc} appartiene a una famiglia di proteine adattatrici denominata Shc (*Src Homology Contain*) che contiene tre diversi membri: ShcA, espressa in modo ubiquitario, ShcB e ShcC che invece risultano espresse in modo specifico a livello del sistema nervoso.

ShcA è la proteina meglio caratterizzata e può esistere in tre isoforme rispettivamente di 46, 52 e 66 kDa. Le tre isoforme sono codificate da uno stesso locus genico e sono costituite da una struttura modulare ampiamente conservata. In particolare, p52^{Shc} e p46^{Shc} condividono

un dominio carbossi-terminale SH2 (*Src Homology Domain 2*) e uno aminoterminale PTB (*Phosphotyrosine Binding Domain*). La p66^{Shc} mostra identità di sequenza con p52^{Shc}/p46^{Shc}, ma possiede un dominio aminoterminale addizionale, ricco in prolina, denominato CH2 (*Collagen Homology 2*). All'interno di questa regione si individua un residuo di serina che può essere fosforilato. Tale residuo rappresenta una caratteristica peculiare di p66^{Shc} e la sua fosforilazione è coinvolta nella traslocazione di questa proteina dal citoplasma allo spazio intermembrana dei mitocondri. Inoltre tra i domini CH2 e PTB è stato individuato un elemento denominato CB, coinvolto nella generazione delle ROS.

Le proteine Shc sono proteine adattatrici coinvolte nelle vie di trasduzione del segnale. La proteina p52^{Shc}, ad esempio, è coinvolta nell'attivazione della divisione cellulare evocata da stimoli mitogenici. Tuttavia, la p66^{Shc} non è coinvolta in questi processi. Per chiarirne la funzione è risultata determinante la generazione di topi *knock-out* (p66^{Shc-/-}) che mostrano un aumento della durata della vita di circa il 30% rispetto al ceppo di controllo. Il ruolo della p66^{Shc} nell'invecchiamento è stato messo in relazione con la formazione delle ROS. In tutti i modelli sperimentali analizzati è stata dimostrata una relazione inversa tra l'espressione di p66^{Shc} e la resistenza allo stress ossidativo. Il meccanismo responsabile di tale relazione consiste nella traslocazione p66^{Shc} dal citoplasma all'interno dei mitocondri dove catalizza il trasferimento degli elettroni dal citocromo c sull'ossigeno con formazione di H₂O₂ che porta a disfunzione mitocondriale favorendo la morte cellulare (Figura 29.1). Al momento non si conoscono molecole in grado di contrastare il processo di traslocazione o di inibire l'attività ossidoreducatrice della p66^{Shc}.

Ruolo fisiologico delle ROS nella trasduzione del segnale intracellulare

Le cellule rispondono a specifici stimoli esterni attraverso un complicato processo che porta alla trasduzione del segnale attraverso la membrana plasmatica innescando poi una risposta biologica. Le vie di segnalazione normalmente contengono elementi quali recettori, proteine trasduttrici, effettori, secondi messaggeri e chinasi, ovvero enzimi che fosforilano substrati diversi modificandone l'attività e/o la funzione. Da oltre 10 anni emergono con continuità informazioni su un sistema di trasduzione del segnale parallelo, basato su reazioni di ossidazione/riduzione, con un sempre crescente interesse nei confronti delle ROS generate a livello mitocondriale. Diversi tipi di ROS possono innescare questi processi anche se, a causa della loro reattività, le specie radicaliche prodotte nei mitocondri difficilmente possono propagare il segnale al di fuori di detti organelli.

L'O₂^{·-} che si produce attraverso la riduzione univalente dell'ossigeno, come già detto, si trasforma per dismutazione spontanea o enzimatica nel più diffusibile H₂O₂, una molecola certamente meno reattiva, che in competizione con enzimi che la inattivano, come la catalasi e

la glutatione perossidasi, potrebbe raggiungere bersagli distali. Per lungo tempo, tuttavia, ci si è chiesti come potessero bassi livelli di H₂O₂ superare indenni queste barriere enzimatiche, per potere poi interagire in modo selettivo con bersagli citosolici o addirittura nucleari. Un dubbio che appare superato dalla cosiddetta regionalità degli eventi. Il concetto è molto simile a quello su cui si basa la specificità degli effetti di molecole polivalenti come il Ca²⁺, per il quale è ben noto che la sua liberazione in specifici microdomini crei il presupposto per cui la sua concentrazione risulti molto più elevata di quella raggiunta in altri distretti. Recenti evidenze suggeriscono l'esistenza di specifici microdomini subcellulari nell'ambito dei quali sono presenti importanti bersagli dell'azione dell'H₂O₂, come ad esempio le tirosine fosfatasi, mentre risultano quasi assenti gli enzimi che inattivano l'ossidante. Si creerebbero in questo modo percorsi preferenziali per la trasduzione di segnali secondo il meccanismo oggi noto come *redox signalling*, che integra gli altri meccanismi mediati da processi di fosforilazione. L'effetto meglio caratterizzato dell'H₂O₂ prevede l'ossidazione dei gruppi sulfidrilici delle cisteine, un effetto in grado di modificare l'attività di enzimi così come le interazioni tra le proteine (ad esempio, formazione di ponti disolfuro) o tra fattori di trascrizione e DNA. Si è fatto in precedenza riferimento alle tirosine fosfatasi, enzimi che integrano la trasduzione del segnale delle tirosine chinasi, regolando il livello di fosforilazione di residui tirosinici di diversi substrati. Esempi di tirosine fosfatasi inibite dall'H₂O₂ sono rappresentati da quelle del tipo 1B, PTEN e MAPK-fosfatasi. Peraltro le ROS possono anche attivare le tirosine chinasi.

Questi sono solo pochi esempi che tuttavia mettono in evidenza l'importanza e l'impatto del *redox signalling* in parallelo ma anche in concerto con le vie classiche di fosforilazione. A prescindere da questa considerazione, tuttavia, ulteriori indicazioni dell'importanza del *redox signalling* si possono evincere dallo stretto rapporto che esiste tra ROS e Ca²⁺, tra cui spesso si innesca un *feed back* positivo reciproco. Il Ca²⁺ promuove la formazione mitocondriale (e non solo) di ROS e queste ultime a loro volta mobilizzano il catione dai siti di deposito. In altre parole, le ROS possono iniziare e propagare segnali anche attraverso la liberazione di Ca²⁺, configurando in questo modo anche i presupposti dell'amplificazione spazio-temporale del *redox signalling*. Non sorprendono, quindi, le sempre maggiori informazioni sul ruolo del *redox signalling*, e del Ca²⁺, nella regolazione di eventi così diversi e complessi quali la proliferazione, la sopravvivenza e la morte cellulare.

Il ruolo patologico delle ROS nella disfunzione e nella morte cellulare

L'H₂O₂ è di per sé una molecola poco reattiva, ma tuttavia genera in presenza di Fe²⁺, che funge da donatore di elettroni, un radicale molto reattivo e tossico, l'OH[·]. Questa reazione, denominata Fenton, oppure di Haber-Weiss quando integrata alla successiva riduzione del Fe³⁺

da parte dell' O_2^- , può avvenire all'interno del mitocondrio, compatibilmente con la disponibilità del metallo di transizione in forma ridotta e libera. In alternativa, grazie alla diffusibilità dell'ossidante, e fatta salva l'eventuale interazione con enzimi che lo metabolizzano (ad esempio, catalasi o glutatone perossidasi), l' H_2O_2 produce l' OH^- nel citosol o anche nel nucleo, con conseguenze ed effetti completamente diversi e con diverse implicazioni. Questi eventi si ripetono senza sosta, perché continuamente, come già discusso, si verificano reazioni di trasferimento elettronico diretto da componenti della catena respiratoria all'ossigeno molecolare. In condizioni normali le ROS prodotte, correttamente bilanciate da diversi sistemi antiossidanti, definiscono il "tono redox" necessario per le risposte fisiologiche della cellula a molteplici stimoli. Tuttavia, l'equilibrio fisiologico tra formazione e rimozione viene sovvertito dalla maggior parte delle condizioni patologiche che riconoscono nell'accumulo delle ROS un importante tratto comune. Tale accumulo che è alla base dello *stress ossidativo* è la conseguenza di un anormale aumento nella formazione di queste specie tossiche, o del venir meno dei sistemi chimici o enzimatici di detossificazione o di entrambi. Le ROS, soprattutto ad alte concentrazioni, sono in grado di attaccare e alterare qualsiasi molecola all'interno della cellula pregiudicando la capacità di mantenere la vitalità. Poiché in molte cellule i mitocondri sono la sorgente principale delle ROS, ne consegue che questi organelli rappresentano al contempo il primo luogo di danno in condizioni di stress ossidativo. Siti particolarmente suscettibili all'attacco ossidativo sono il complesso I della catena respiratoria nella IMM e, nella matrice, l'aconitasi e le deidrogenasi contenenti acido lipoico, che costituiscono tappe fondamentali del ciclo di Krebs. Di conseguenza, vengono alterati più o meno profondamente l'intero metabolismo ossidativo, la respirazione cellulare e la fosforilazione ossidativa. Inoltre può essere compromessa l'integrità della IMM dalla degradazione della cardiolipina, particolarmente suscettibile alla perossidazione lipidica. Questo evento contribuisce anche al rilascio del citocromo c che, con le sue cariche positive, è legato alla faccia esterna della IMM mediante ponti salini con le cariche negative proprio della cardiolipina. L'accumulo di queste lesioni comporta il reclutamento progressivo di altri eventi che a loro volta alimentano un circuito perverso che può portare la cellula alla morte. Semplificando il concetto si potrebbe dire che il limite tra fisiologia e patologia viene fissato dalla quantità di ROS mitocondriali prodotte in funzione del tempo, una sintesi che, pur corretta, risulta tuttavia limitativa in quanto non tiene conto di numerose variabili esterne che possono influenzare eventi che stimolano, o inibiscono, le vie di trasduzione del segnale che promuovono sopravvivenza.

Il ruolo fisiopatologico dell'omeostasi mitocondriale del Ca^{2+}

Il ruolo tossico svolto dall'accumulo delle ROS è incrementato se in concomitanza si verifica un aumento delle

concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} . Anche nel caso dell'omeostasi del Ca^{2+} , il superamento di valori soglia trasforma segnali rilevanti per la fisiologia cellulare in processi che rendono problematica la sopravvivenza della cellula. Sia per le risposte fisiologiche, sia per i processi patologici, i mitocondri occupano una posizione cruciale. Questi organelli hanno una grande capacità di accumulare Ca^{2+} mediante un meccanismo di uniporto che utilizza come forza trainante il potenziale mitocondriale (negativo all'interno) (vedi anche Capitolo 9). Occorre notare che l'ingresso di Ca^{2+} nei mitocondri è in competizione con la sintesi dell'ATP, poiché entrambi utilizzano il potenziale elettrochimico dei protoni stabilito dalla respirazione mitocondriale. In base a questo potenziale, e in accordo con l'equazione di Nernst, sarebbe teoricamente possibile ottenere concentrazioni di Ca^{2+} nella matrice prossime a 0,1 M, cioè sei ordini di grandezza maggiori di quelle esistenti nel citoplasma (circa 100 nM). Tale condizione, che si tradurrebbe in una profonda alterazione della funzione e della struttura dei mitocondri, è prevenuta dal parallelo efflusso del catione, in particolare attraverso lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} che, in analogia allo scambiatore della membrana plasmatica, opera in modo elettroforetico scambiando 3 ioni Na^+ con uno ione Ca^{2+} . Anche l'efflusso del catione è quindi dipendente dal potenziale mitocondriale. A sua volta, l' Na^+ è riportato all'esterno da uno scambiatore Na^+/H^+ e infine i protoni sono pompati all'esterno dalla catena respiratoria.

In condizioni fisiologiche, l'importo mitocondriale del Ca^{2+} assolve alla funzione di accoppiare le maggiori richieste energetiche dettate dall'aumento di questo ione nel citoplasma con una maggiore disponibilità di ATP. Infatti, all'interno della matrice, il Ca^{2+} stimola la decarbossilazione ossidativa degli acidi piruvico, isocitrico e α -chetoglutarico. Di conseguenza, aumentando la disponibilità di equivalenti riducenti, con un meccanismo di spinta in avanti (*feed forward*), cresce il flusso di elettroni nella catena respiratoria con il risultato ultimo di un incremento nella sintesi dell'ATP. La K_m per il Ca^{2+} delle tre deidrogenasi di matrice è intorno a 500 nM. Questo valore sembra una soglia al di sotto della quale il Ca^{2+} svolge un ruolo fisiologico, mentre un prolungato innalzamento oltre questo valore rende il Ca^{2+} attivatore di processi che alterano la funzione e la struttura dei mitocondri e del resto della cellula. Il Ca^{2+} è infatti in grado di stimolare idrolasi, quali fosfolipasi e proteasi, che catalizzano la degradazione di fosfolipidi e proteine. Tuttavia, al di là delle possibili alterazioni strutturali, l'apertura del PTP (che viene discussa più avanti) appare essere il meccanismo principale attraverso il quale un innalzamento patologico del Ca^{2+} determina condizioni difficilmente compatibili con la sopravvivenza cellulare. Occorre notare che il sovraccarico mitocondriale di Ca^{2+} è conseguenza di un abnorme aumento delle concentrazioni di questo catione nel citosol. L'accumulo nei mitocondri avrebbe la funzione di ridurre la concentrazione citoplasmatica, limitando in questo modo il ruolo dannoso esercitato da alti livelli di Ca^{2+} . Questo meccanismo – potenzialmente protettivo – resta valido

finché l'importo di Ca^{2+} non ostacola la sintesi di ATP, e soprattutto non provoca l'apertura del PTP, trasformando un processo inizialmente fisiologico e di difesa in un meccanismo letale.

Questo paradosso non è ascrivibile ai soli mitocondri. Infatti, in condizioni di danni a carico della catena respiratoria, i mitocondri cercano di mantenere il potenziale transmembrana attraverso l'inversione dell'attività della F_0F_1 ATP sintetasi. Infatti, l'idrolisi dell'ATP prodotto dalla glicolisi consente il pompaggio dei protoni nello spazio intermembrana ristabilendo la negatività della matrice. In tal modo, il mitocondrio cessa di essere il luogo elettivo per la sintesi dell'ATP e, divenendone il principale sito di consumo, contribuisce alla sua deplezione con conseguente induzione della morte cellulare. L'inversione della funzione della ATP sintetasi in risposta alla disfunzione della catena respiratoria e dell'apertura del PTP è sfortunatamente un processo non sempre tenuto nella giusta considerazione. È opportuno sottolineare il fatto che questo evento gioca un ruolo di rilievo non solo nel danno ischemico, ma anche nella tossicità di numerose sostanze, in particolare a livello miocardico. Circa la metà dei farmaci, infatti, non arrivano all'uso clinico per la loro tossicità a livello miocardico e l'uso di molti composti antitumorali, come le antracicline, è limitato dalla loro cardiotoxicità.

Per quanto attiene all'omeostasi del Ca^{2+} cellulare in relazione all'importo nei mitocondri, sebbene sia possibile un innalzamento generalizzato nel citoplasma che si traduce in un sovraccarico nello spazio della matrice, appare molto più probabile che le variazioni di Ca^{2+} nei mitocondri dipendano dalla stretta relazione spaziale con il reticolo (endo- o sarcoplasmatico). La giustapposizione di questi organelli fa sì che il Ca^{2+} liberato dal reticolo in risposta a stimolazione di recettori di membrana, o a eventi intracellulari, sia immediatamente captato dai mitocondri con l'attivazione di processi fisiologici o patologici a seconda delle quantità di Ca^{2+} in gioco. Inoltre sfruttando la contiguità, il Ca^{2+} rilasciato dal reticolo non diffonde nel citoplasma, ma si creano invece dei microdomini a elevata concentrazione che rendono più efficace l'importo all'interno dei mitocondri che sarebbe altrimenti limitato nella sua capacità da una bassa affinità dell'uniporto per il Ca^{2+} .

In riferimento allo *stress ossidativo*, osservazioni su svariati modelli sperimentali hanno stabilito che esiste una relazione diretta tra accumulo delle ROS e sovraccarico di Ca^{2+} . È difficile definire per ogni condizione quale sia la causa e quale la conseguenza. Tuttavia, anche in assenza di precisi nessi di causalità, molti meccanismi sostengono l'instaurarsi di un circolo vizioso che amplifica la noxa iniziale, sia questa l'aumento di Ca^{2+} o di ROS. Il Ca^{2+} , infatti, può promuovere la formazione di O_2^- aumentando la concentrazione dell'intermedio QH^\cdot nel ciclo Q. In altre parole, la stimolazione della fosforilazione ossidativa, e quindi l'aumentato consumo di ossigeno, implicherebbero un parallelo aumento del numero di elettroni deviati sull'ossigeno molecolare. Il Ca^{2+} inoltre stimola l'attività della NO sintasi costitutiva e l'NO a sua

volta stimola la produzione di O_2^- nel ciclo Q attraverso l'inibizione dell'attività della citocromo ossidasi. Un ulteriore effetto osservato in presenza di NO e accumulo mitocondriale di Ca^{2+} è rappresentato dalla formazione di O_2^- nel complesso I, un dato particolarmente interessante dal momento che il complesso I è nella norma molto resistente agli effetti del solo NO o del solo Ca^{2+} . Infine, come verrà discusso nel paragrafo successivo, il Ca^{2+} e le ROS contribuiscono entrambi all'apertura del PTP che amplifica lo stress ossidativo determinando la parallela inibizione del complesso III e la perdita di glutatione ridotto mitocondriale.

Il poro della transizione della permeabilità mitocondriale

La transizione della permeabilità (PT) costituisce in effetti una perdita di permeabilità della IMM. La conversione dell'energia a livello di questa membrana richiede l'impermeabilità a qualsiasi specie, in particolare ai protoni, affinché si mantenga il potenziale elettrochimico dei protoni ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) o forza protomotrice ($\Delta\pi$). Come già accennato nei paragrafi precedenti, gli scambi di ioni e metaboliti sono assicurati selettivamente da trasportatori che devono rigorosamente garantire il mantenimento del gradiente di carica e l'equilibrio osmotico ai due lati della IMM. L'instaurarsi della PT rende la IMM improvvisamente permeabile a molecole con massa fino a 1,5 kDa a causa dell'apertura di un canale voltaggio-dipendente definito PTP (Figura 29.2).

L'identità molecolare del PTP è tuttora sconosciuta. Studi genetici hanno dimostrato che l'ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*) e il VDAC (il canale voltaggio-dipendente per gli anioni situato nella OMM) non costituiscono il PTP, ma semplicemente possono partecipare alla sua modulazione. Tra le proteine implicate nella regolazione del PTP occupa un posto prominente la ciclofilina D (CypD), una componente della famiglia delle ciclofiline (vedi Capitolo 45) localizzata nella matrice mitocondriale. Attraverso modalità ancora da definire, in risposta a diversi stimoli, tra i quali occupa un ruolo centrale l'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]$ nella matrice, la CypD si lega alla IMM aumentando la probabilità dell'apertura del PTP. Questo meccanismo è stato confermato geneticamente in quanto la delezione della CypD si associa a una marcata riduzione della suscettibilità all'apertura del PTP.

L'attenzione sulla CypD è anche derivata dalla sua inibizione farmacologica. Al pari della CypA la CypD lega la ciclosporina A (CsA) e questo legame si traduce in una riduzione della probabilità di apertura del PTP pari a quella ottenuta mediante l'ablazione genetica della CypD. L'effetto della CsA viene generalmente definito di inibizione del PTP. Tuttavia, la delezione della CypD o il suo legame con la CsA riducono la sensibilità per il Ca^{2+} . Aumentando la concentrazione intramitocondriale di questo catione sarà ugualmente possibile ottenere l'apertura del PTP. Pertanto è più corretto descrivere l'effetto della CsA come desensibilizzazione. Inoltre, da un lato l'assenza di effetto della CsA non esclude il coinvolgimento del PTP, dall'altro gli effetti

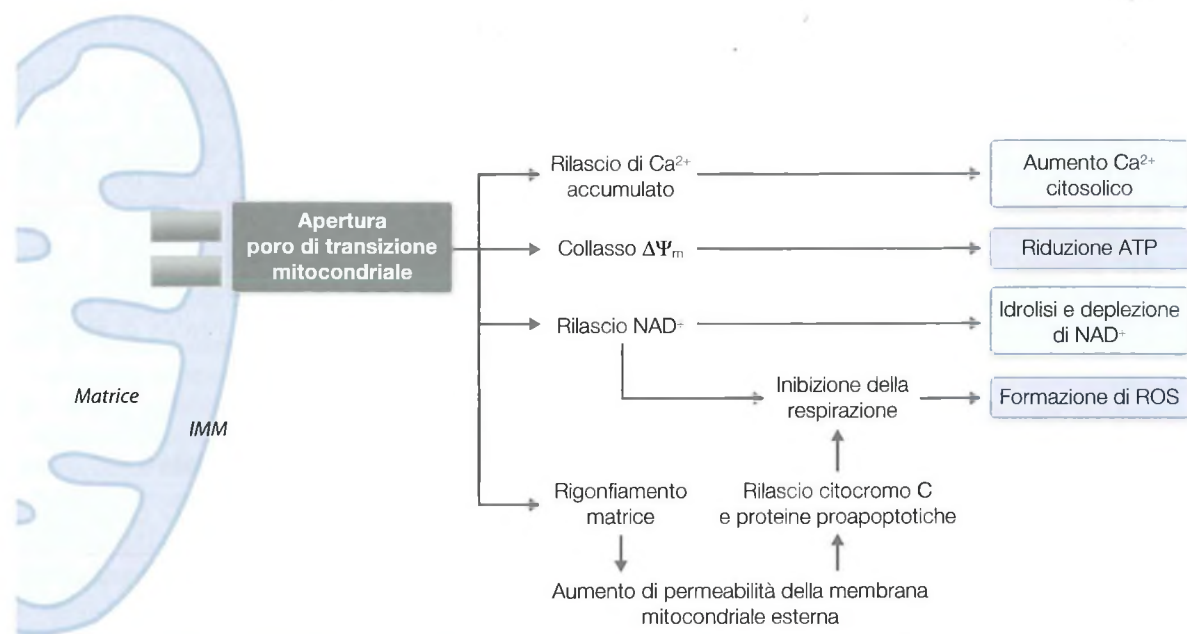


FIGURA 29.2 Schema riassuntivo delle principali conseguenze fisiopatologiche dovute all'apertura del poro di transizione mitocondriale.

della CsA possono essere ricondotti anche al legame con altre ciclofiline. A questo riguardo studi recenti mostrano che la protezione mitocondriale esercitata dalla CsA potrebbe ricevere un contributo rilevante dalla inibizione della calcineurina, causata dal legame con il complesso CypA-CsA. La calcineurina, infatti, defosforilando la Drp1 (vedi **CD**: Approfondimento 29.1), ne provoca la traslocazione dal citoplasma al mitocondrio dove promuove la frammentazione che è stata associata con una maggiore incidenza di morte cellulare nel miocardio ischemico. La maggior parte dei composti in grado di inibire l'apertura del PTP ha come bersaglio molecolare la CypD. Oltre alla CsA è stata riportata la capacità di antagonizzare l'apertura del poro da parte del Nim 811, del Debio 025 e della Sangliferina A. Tutti questi composti agiscono legandosi alla CypD. Tuttavia, è possibile ridurre la probabilità di apertura del poro sia con derivati del coenzima Q che presumibilmente agiscono a livello della IMM, sia con composti, quali il TRO40303, che a livello della OMM interagiscono con il TSPO (*mitochondrial translocator protein*), conosciuto anche come PBR (*Peripheral Benzodiazepine Receptor*) (vedi anche Capitolo 37).

L'equilibrio tra apertura e chiusura del PTP è finemente controllata da una nutrita schiera di composti o processi che agiscono fisiologicamente da agonisti o antagonisti. Oltre all'aumento della $[Ca^{2+}]$ intramitocondriale, l'apertura del PTP è favorita dalle ROS, da una riduzione del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) e dal fosfato, che paradossalmente è tuttavia necessario per conferire la desensibilizzazione indotta dagli interventi genetici o farmacologici sulla CypD. Tra i principali antagonisti fisiologici si annoverano l'acidosi, il Mg^{2+} e alti valori di $\Delta\Psi_m$. Il contrapporsi di tanti elementi nel controllo del PTP ne sottolinea l'importanza che pre-

sumibilmente deve avere anche risvolti fisiologici. Ad esempio, il PTP rappresenta verosimilmente un canale per il rapido efflusso di Ca^{2+} dalla matrice mitocondriale. Risultati recenti mostrano che la delezione della CypD si associa ad aumento della $[Ca^{2+}]$ intramitocondriale che appare favorire l'evoluzione dell'ipertrofia in dilatazione e scompenso cardiaco. L'apertura del PTP potrebbe anche favorire una rapida redistribuzione intracellulare dei piridin nucleotidi che sono concentrati per oltre l'80% del totale cellulare nella matrice, mentre sono utilizzati per numerose funzioni, diverse dal metabolismo ossidativo, nel citoplasma e in altri organelli cellulari.

Anche se resta da definirne il ruolo fisiologico, è indubbio che l'apertura del PTP, specie se prolungata, crei condizioni difficilmente compatibili con il mantenimento della vitalità cellulare. A livello mitocondriale il brusco aumento di permeabilità determina uno stato simile al disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa con immediato collasso del $\Delta\Psi_m$, dissipazione dei gradienti ionici e rapida deplezione dell'ATP per attivazione della funzione inversa della FoF1 ATP sintetasi nel futile tentativo di mantenere il $\Delta\Psi_m$. Inoltre, l'apertura del PTP consente la fuoriuscita di metaboliti accumulati in matrice, quali il $NAD(P)^+$ e il CoA, che perdono quindi la potenzialità di promozione dell'ossidazione dei substrati. Un'ulteriore conseguenza è lo squilibrio osmotico che richiama acqua all'interno dei mitocondri. Il rigonfiamento della matrice e la riorganizzazione delle creste possono portare alla rottura della membrana mitocondriale esterna che, provocando il rilascio del citocromo c, stimola l'apoptosi, mentre le profonde alterazioni del metabolismo energetico favoriscono la morte cellulare per necrosi.

L'apertura del PTP potrebbe dunque rappresentare una valida strategia per eliminare cellule indesiderate, come

nel caso dei tumori. Tuttavia l'approccio più studiato è stato quello della inibizione del PTP in patologie connesse e determinate dalla morte cellulare. Studi sperimentali hanno dimostrato l'efficacia di questa strategia in modelli di danno epatico, neurodegenerazione, distrofia muscolare e danno ischemico del cuore e del cervello. La validità è stata di recente estesa all'ambito clinico dimostrando l'efficacia terapeutica della CsA nel ridurre sia l'estensione della necrosi nell'infarto del miocardio, sia l'apoptosi dei miociti nella distrofia causata da alterazioni del collagene VI.

Effetti di alcuni farmaci a livello mitocondriale

I mitocondri rivestono un ruolo primario nel controllo di numerose funzioni fisiologiche vitali che includono non solo la produzione di ATP nella catena respiratoria, ma anche il controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} e la produzione delle ROS. Queste ultime funzioni, tuttavia, possono per motivi diversi, ovvero a seguito dell'esposizione a sostanze tossiche, con l'invecchiamento, nell'ambito di diverse patologie, a causa di mutazioni del DNA mitocondriale o genomico, subire alterazioni che innescano inevitabilmente un circolo vizioso, caratterizzato da alterazioni del Ca^{2+} mitocondriale, dell'ATP e della formazione delle ROS, con conseguente disfunzione, ed eventualmente, morte cellulare.

Da un punto di vista generale, a seconda della patologia in atto, si rivelano efficaci sia il contrastare la disfunzione mitocondriale (come nel caso delle malattie cardiovascolari e degenerative), sia il favorirla (come nel caso dei tumori). Le strategie disponibili per azioni a livello mitocondriale possono essere raggruppate come indicato di seguito.

Antiossidanti direzionati ai mitocondri

In linea di principio, è possibile veicolare direttamente nei mitocondri molecole diverse che possano neutralizzare le ROS prodotte in eccesso in questo distretto. È questo il caso di alcuni cationi lipofili ad attività antiossidante, che nei mitocondri si concentrano, creando in questo modo i presupposti per una terapia mirata di prevenzione della morte cellulare. Evidenze sperimentali indicano che questa strategia terapeutica è valida per ridurre la morte cellulare. Potrebbe dunque essere applicata a patologie cardiovascolari (ad esempio, infarto del miocardio, ictus ecc.), diverse neuropatologie (ad esempio, morbo di Parkinson, malattia di Alzheimer ecc.), patologie infiammatorie croniche (ad esempio, artrite reumatoide ecc.), malattie metaboliche (ad esempio, diabete e obesità).

Farmaci ad azione su canali mitocondriali per prevenire la disfunzione mitocondriale

Come già illustrato per la CsA, l'attenzione maggiore è sulla modulazione farmacologica del PTP. Poiché ancora non si conosce la natura molecolare del PTP, i bersagli farmacologici sono tutti indiretti. Oltre alle molecole che interagiscono sulla CypD illustrate nel paragrafo

precedente, alcuni farmaci possono modulare la PTP favorendo l'apertura (ad esempio, diazossido) o la chiusura (ad esempio, glibenclamide) dei canali del potassio ATP sensibili, oppure attraverso interazione con il recettore periferico delle benzodiazepine, una componente regolatrice del poro. È anche evidente come la PTP possa essere indirettamente modulata interferendo con vie di segnalazione che regolano la fosforilazione di substrati diversi che promuovono (ad esempio, defosforilazione di Bad) o inibiscono (fosforilazione di Bad) l'attività anti-PTP di Bcl₂ o Bcl_{XL}.

Farmaci che favoriscono la disfunzione mitocondriale per possibile impiego antineoplastico

Dal momento che i mitocondri giocano un ruolo centrale nella regolazione della via intrinseca dell'apoptosi, appare ovvio come l'induzione della disfunzione mitocondriale rappresenti una strategia terapeutica di grande importanza per il controllo delle patologie neoplastiche. Le ricerche in questo campo sono allo stato attuale numerosissime. A titolo di esempio possono essere citati la lonidamina, un inibitore della esochinasi (una componente del PTP), ma anche un ligando di ANT, o alcuni bifosfonati che agirebbero secondo lo stesso meccanismo. Oppure l'As₂O₃, che interagisce con gruppi tiolici, in particolare associati a proteine del poro. Più in generale, la disfunzione mitocondriale viene mediata anche da molti altri farmaci antitumorali, che agiscono a livello di bersagli extramitocondriali, ma che tuttavia evocano eventi che convergono nel meccanismo apoptotico mitocondriale. Infine, la disfunzione mitocondriale può essere responsabile di effetti indesiderati importanti, ad esempio la cardiotoxicità nel caso delle antracicline, il cui effetto antitumorale è principalmente mediato dall'interazione del farmaco con il DNA genomico.

Farmaci ad azione sul metabolismo mitocondriale

Esistono infine farmaci, impiegati da tempo nella pratica clinica, che producono effetti avversi in parte attribuibili alla loro capacità di interferire con specifiche funzioni mitocondriali. È questo il caso di alcuni farmaci antinfiammatori non steroidei, che inibiscono la β -ossidazione degli acidi grassi e causano disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa, in parte per induzione di PTP. È anche il caso di anestetici locali, che ugualmente causano disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e inibiscono la F₀F₁ ATPasi.

Una strategia che viene ritenuta importante nelle sindromi ischemiche è la riduzione dell'ossidazione degli acidi grassi a favore di quella del glucosio. Questo obiettivo può essere ottenuto, anche clinicamente, attraverso l'inibizione della carnitina palmitoil trasferasi I da parte della perexilina, oppure mediante la stimolazione della piruvico deidrogenasi da parte della carnitina o del dicloroacetato.

Per quanto attiene al metabolismo, occorre infine puntualizzare che farmaci utilizzati nel vasto campo delle sindromi metaboliche (diabete, obesità, arteriosclerosi) svolgono la loro azione anche attraverso effetti mitocondriali.

L'esempio più noto viene dai fibrati che, interagendo con i recettori per la proliferazione perossisomiale α (PPAR α), stimolano la biogenesi mitocondriale e in particolare l'espressione di diversi enzimi dell'ossidazione degli acidi grassi. Analogamente la biogenesi mitocondriale e l'ossidazione lipidica vengono stimulate dai tiazolinedio-

nici per interazione, soprattutto a livello epatico, con i PPAR γ . Inoltre, questa stessa classe di composti, al pari della metformina, è stata dimostrata inibire il complesso I della catena respiratoria. Tale effetto sembra rivestire un ruolo importante nell'efficacia terapeutica di queste sostanze contro il diabete di tipo 2.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I mitocondri svolgono un ruolo centrale nella formazione delle ROS coinvolgendo diversi sistemi spesso sinergici tra loro.
- ▶ Le ROS sono dei veri e propri messaggeri intracellulari che trasducono segnali inibitori o attivatori.
- ▶ Una eccessiva produzione di ROS mitocondriali è uno degli eventi chiave di innesco dei processi di morte cellulare che coinvolge in particolare l'apertura del poro di transizione mitocondriale.
- ▶ Prevenire lo stress ossidativo agendo specificamente a livello mitocondriale e in particolare sul poro di transizione è una strategia già adottata in molti modelli di danno.

Bibliografia essenziale

- ▶ Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 2005;120:483-95.
- ▶ Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999;79:1127-55.
- ▶ Bernardi P, Krauskopf A, Basso E et al. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J* 2006;273:2077-99.
- ▶ Di Lisa F, Canton M, Carpi A et al. Mitochondrial injury and protection in ischemic pre- and postconditioning. *Antioxid Redox Signal* 2011;14:881-91.
- ▶ Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
- ▶ Wasilewski M, Scorrano L. The changing shape of mitochondrial apoptosis. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:287-94.

Il controllo farmacologico della sintesi dei lipidi

CAPITOLO

30

Lorenzo Arnaboldi, Alberto Corsini, Nicola Ferri

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le basi teoriche e le nozioni generali circa l'importanza, la funzione, il metabolismo dei lipidi e le patologie a essi correlate (dislipidemie, sindrome metabolica, tumori e patologie del sistema nervoso centrale)
- ▶ Acquisire le nozioni fondamentali sui bersagli cellulari e biochimici dei farmaci a disposizione, sull'efficacia clinica delle molecole in commercio e sulle prospettive offerte da quelle di origine naturale e in sperimentazione
- ▶ Acquisire le nozioni generali sui diversi approcci farmacologici utilizzati nel controllo della biosintesi del colesterolo (statine, inibitori della squalene sintetasi), degli acidi grassi (inibitori della FAS e della SCD-1), dei trigliceridi (inibitori della DGAT), nella trascrizione di geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi (ligandi di LXR, agonisti di PPAR), delle proteine di trasferimento dei lipidi (inibitori di ACAT, CETP, MTP)

I lipidi sono molecole istologicamente e metabolicamente essenziali negli organismi viventi. Se il colesterolo è il costituente fondamentale delle membrane cellulari ed è precursore di acidi biliari e ormoni steroidei, i trigliceridi (TG) rappresentano una fonte energetica grazie all'ossidazione degli acidi grassi costituenti, mentre i fosfolipidi formano e mantengono membrane cellulari e lipoproteine, regolando i processi di esocitosi/endocitosi, fusione sinaptica e trasmissione nervosa. Infine, lipidi specifici fungono da mediatori e antiossidanti intracellulari, quali inositidi, eicosanoidi, fattore di attivazione piastrinico (PAF), lisofosfolipidi, sfingolipidi, plasmalogeni.

Per svolgere queste funzioni, il metabolismo dei lipidi è finemente regolato e conservato nella scala evolutiva, mediante il controllo di enzimi chiave. Aberrazioni o alterazioni lipidiche sono alla base di aterosclerosi, tumori, obesità, ma anche di sindrome metabolica e steatosi epatica non alcolica, queste due ultime in costante ascesa nel mondo occidentale. Poiché la modulazione farmacologica della sintesi dei lipidi è da sempre un caposaldo nella cura delle patologie sopradescritte, in questo capitolo verranno illustrati gli inibitori di origine naturale, sintetica o biotecnologica (in clinica o in via di sviluppo), degli enzimi coinvolti nella sintesi di colesterolo, TG e acidi grassi (Figura 30.1). Per i dettagli, *vedi*

CD: Approfondimenti 30.1-30.6. Gli inibitori delle modifiche lipidiche post-traduzionali delle proteine, della

sintesi di eicosanoidi, lipossine, resolvine e protettine non sono oggetto di questo capitolo. Nel box 30.1 vengono elencati i principali acronimi relativi all'argomento trattato nel capitolo.

BOX 1 Glossario

- ▶ ACAT: acil-coenzima A-colesterolo aciltrasferasi
- ▶ CETP: proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo
- ▶ DGAT: diacilglicerolo aciltrasferasi
- ▶ FAS: sintetasi degli acidi grassi
- ▶ FFA: acidi grassi liberi
- ▶ GPAT: glicerolo-3-fosfato aciltrasferasi
- ▶ HDL: lipoproteine a elevata densità
- ▶ HMG: 3-idrossi-3-metilglutarile
- ▶ LDL: lipoproteine a bassa densità
- ▶ LXR: *Liver X Receptor*
- ▶ MTP: proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi
- ▶ PPAR: *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*
- ▶ SCD: stearoil-CoA desaturasi
- ▶ SS: squalene sintetasi
- ▶ TG: trigliceridi
- ▶ VLDL: lipoproteine a densità molto bassa

Biosintesi del colesterolo

Il colesterolo nell'organismo deriva dalla dieta (assorbimento intestinale) e dalla biosintesi endogena (prevalentemente epatica) ed è il prodotto quantitativamente più importato della via biosintetica del mevalonato, della quale la 3-idrossi-3-metil-glutaril-Coenzima A (HMG-CoA) reduttasi rappresenta l'enzima chiave e più finemente regolato (Figura 30.2). L'enzima umano è una glicoproteina consistente in tre domini, funzionale in forma tetrameric; la sua attività è regolata trascrizionalmente, per fosforilazione/defosforilazione e per variazione del tempo di emivita in base al contenuto intracellulare di colesterolo (vedi CD: Approfondimento 30.1. *Farmacologia della via biosintetica del mevalonato*). Visto che circa due terzi del colesterolo umano sono di biosintesi epatica, la HMG-CoA reduttasi è un bersaglio ideale per la cura delle ipercolesterolemie.

Le statine: inibitori della HMG-CoA reduttasi

Sono i farmaci più efficaci e sicuri nella cura delle ipercolesterolemie

La terapia ipocolesterolemizzante più efficace si basa sull'inibizione della HMG-CoA reduttasi (Figura 30.2) mediante le statine, gli agenti farmacologici più comunemente prescritti per ridurre il colesterolo-LDL (C-LDL) e le patologie cardiovascolari associate. Queste molecole

presentano una porzione simile al HMG (anche in forma lattonica inattiva, enzimaticamente idrolizzata in vivo a idrossiacido attivo), e una rigida composta da gruppi idrofobici legati alla porzione simile al HMG (Figura 30.3). Il capostipite, la mevastatina o compactina, isolata nel 1979 da colture di *Penicillium*, pur non utilizzata in clinica, ha permesso lo sviluppo di analoghi oggi utilizzati per il trattamento delle dislipidemie (Figura 30.3). Alla diminuzione della sintesi di colesterolo (essenzialmente epatica) con statine, seguono un'aumentata espressione del gene del recettore per le LDL e un'aumentata captazione delle LDL circolanti, con conseguente riduzione del C-LDL plasmatico (per una descrizione più esaustiva del meccanismo d'azione delle statine, vedi CD: Approfondimento 30.1). La terapia standard con statine (ad esempio, 20-40 mg/die di simvastatina) riduce il C-LDL di circa un terzo, ma si assiste a diminuzioni fino al 50% con dosi più elevate o con statine più potenti (40-80 mg/die di atorvastatina o 10-40 di rosuvastatina). Le statine, inoltre, riducono i TG del 10-20% e aumentano il colesterolo-HDL (C-HDL) del 5-10%. Una metanalisi condotta nel 2005 su studi clinici randomizzati ha dimostrato come una riduzione del C-LDL di 1 mmol/L diminuisca di circa un quinto l'incidenza a 5 anni di eventi cardiovascolari gravi, rivascolarizzazioni e ictus ischemici. Dati recentissimi di una metanalisi condotta su 26 studi clinici (170.000 pazienti) dimostrano come un'ulteriore riduzione del C-LDL (1-2 mmol/L) riduca ancor più significativamente l'incidenza di eventi cardiovascolari.

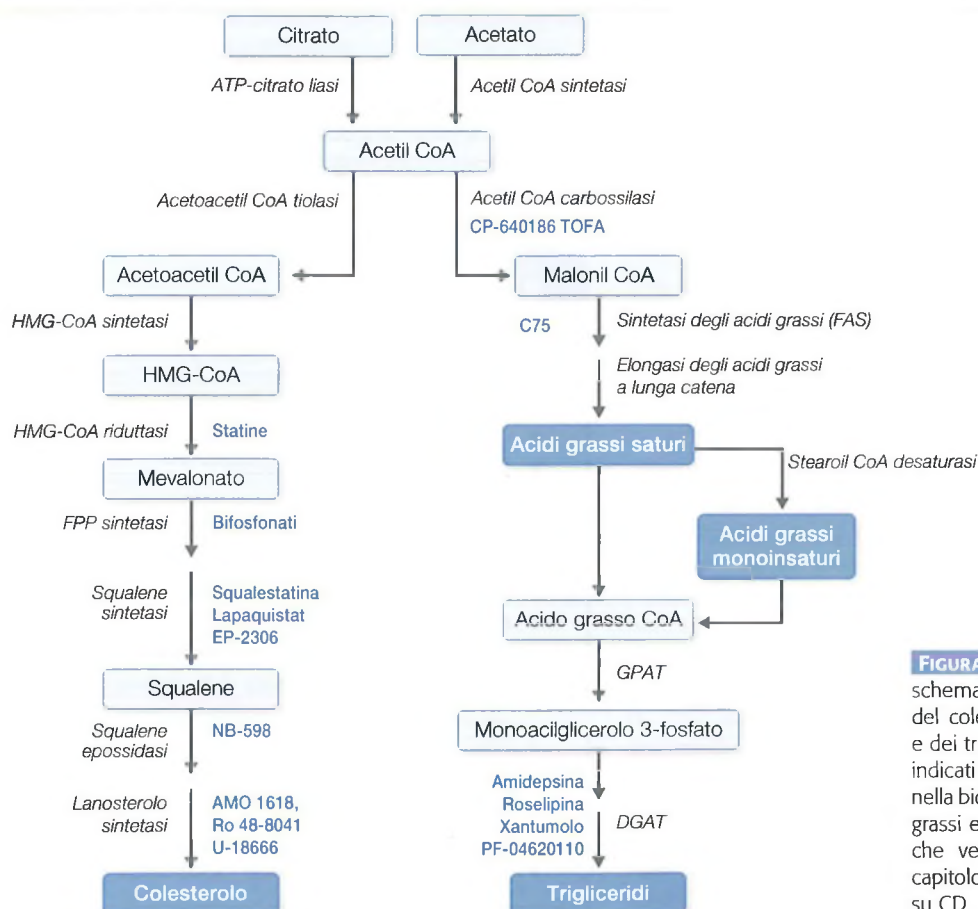


FIGURA 30.1 Rappresentazione schematica della via biosintetica del colesterolo, degli acidi grassi e dei trigliceridi. Nella figura sono indicati gli enzimi chiave coinvolti nella biosintesi di colesterolo, acidi grassi e trigliceridi con gli inibitori che vengono trattati in questo capitolo e negli Approfondimenti su CD.

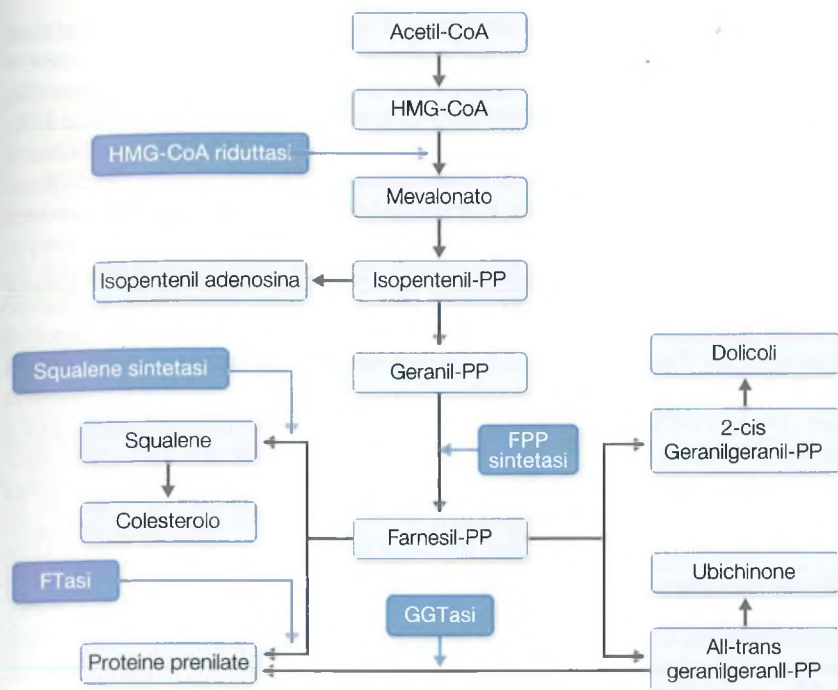


FIGURA 30.2 Via metabolica del mevalonato. Sono illustrati i principali enzimi e intermedi che portano alla formazione non solo del colesterolo, ma anche di molecole isopreniche essenziali per l'omeostasi cellulare (farnesolo, geranilgeraniolo, ubiquinone, dolicoli). (Da: Arnaboldi L et al. Immun Endoc Metab Agents Med Chem 2008;8:122-40, modificata)

Inibitori della farnesil-PP sintetasi (nitro-bisfosfonati)

La farnesil-pirofosfato sintetasi genera il farnesil-pirofosfato

La farnesil-pirofosfato sintetasi (FPPS) è l'enzima della via metabolica dell'MVA che catalizza la condensazione tra il dimetilallil-pirofosfato con 2 unità di 3-isopentenil pirofosfato, per generare il farnesil-pirofosfato (FPP) (Figura 30.2). I suoi principali inibitori farmacologici sono i bisfosfonati contenenti azoto, tra i quali risedronato, pamidronato, zoledronato, alendronato e ibandronato (Figura 30.4 nella quale sono rappresentati anche etidronato e clodronato), analoghi stabili dei pirofosfati inorganici presenti in natura. La loro degradazione biologica è impedita dalla sostituzione dell'ossigeno tra i due gruppi fosfato con un atomo di carbonio. I bisfosfonati rappresentano la classe di farmaci più utilizzata nel trattamento dell'osteoporosi e di altre patologie caratterizzate da aumentato riassorbimento osseo, grazie alla capacità di legarsi avidamente all'osso, di inibire la precipitazione del fosfato di calcio in soluzione, di ritardare la trasformazione da forma amorfa a cristallina dell'idrossiapatite e infine di

inibire aggregazione e dissoluzione dei cristalli. Successivamente a questo loro impiego, è stato scoperto come i nitro- (ma non i bisfosfonati) siano in grado di inibire la FPPS, con le seguenti potenze: etidronato = clodronato (estremamente debole; bisfosfonati) <<<< pamidronato < alendronato < ibandronato < risedronato < zoledronato. I valori di IC₅₀ sono compresi tra 4,1 nM (zoledronato) e 330 nM (alendronato). Inibendo la FPPS, i nitrobisfosfonati riducono nell'osso la prenilazione di proteine ad attività GTPasica essenziali per la funzione e la sopravvivenza degli osteoclasti, con accumulo del precursore isopentenil pirofosfato (IPP) e produzione di un nuovo metabolita, l'ApppI, analogo dell'ATP formato dalla condensazione della adenosina monofosfato con IPP, che induce apoptosi negli osteoclasti. Questo fenomeno, assieme all'accumulo di proteine GTPasiche non prenilate, è parte integrante dell'effetto farmacologico dei nitrobisfosfonati. A causa del tropismo per il tessuto scheletrico, la somministrazione di 70 mg/settimana di alendronato non ha ridotto significativamente né il C-totale né i TG in donne postmenopausa con osteoporosi, non consentendone l'utilizzo come ipolipidemizzante.

Inibitori della squalene sintetasi

È il primo enzima della porzione della via del MVA dedicata alla sintesi del colesterolo

La squalene sintetasi (SS) è fondamentale nel determinare il destino metabolico di MVA (Figura 30.2). È una proteina monomerica microsomiale associata al reticolo endoplasmico, non soggetta a modifiche post-traduzionali o a feed-back positivi, ma modulabile anche dalle concentrazioni di colesterolo intracellulari (vedi CD: Approfondimento 30.1).

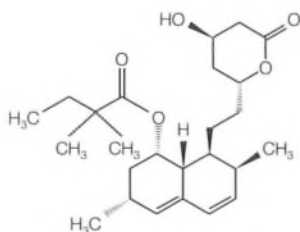


FIGURA 30.3 Struttura chimica di una statina.

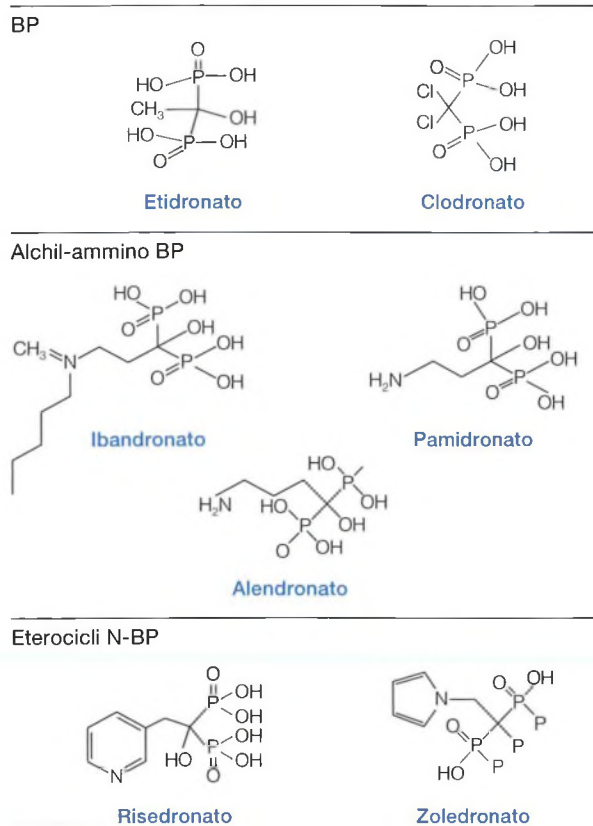


FIGURA 30.4 Struttura chimica dei bifosfonati e dei nitrobifosfonati.

Negli anni 90, sintetizzando ipocolesterolemizzanti selettivi e che non provocassero accumulo di steroli, sono stati identificati gli inibitori della squalene sintetasi (Figura 30.5). Oltre la squalestatina i più noti sono: 1,1 bifosfonati, chinuclidine, 2-difenilmorfoline e 4,1 benzoxazepine. Se la squalestatina, nonostante le proprietà ipolipidemizzanti, antitumorali e antifungine è stata abbandonata per effetti collaterali su retina e sistema nervoso, 1,1 bifosfonati e chinuclidine lo sono stati per epato-, nefrotossicità e cinconismo. Tra le 2-difenilmorfoline, EP-2306 inibisce la sintesi di colesterolo e TG nelle cellule HepG2, evidenziando anche attività antiaterosclerotiche e antiossidanti nel ratto e nel coniglio in dieta ipercolesterolica (~50%

placca ateromasica), senza apparente tossicità. In studi in vitro, vari composti, quali BMS-187745, BMS-188494 e ER-27856, hanno inibito la sintesi del colesterolo, diminuito il C-LDL e aumentato i recettori delle LDL, senza mitotossicità. Il composto YM-53601 ha ridotto il colesterolo non-HDL del 47% nelle cavie e del 37% nel macaco Rhesus. Tra le 4,1 benzoxazepine si annovera l'unico composto che ha raggiunto la fase III, il lapaquistat acetato, potente inibitore della squalene sintetasi. Da studi preclinici, oltre a diminuire la sintesi del colesterolo e dei TG (ratti Wistar), aumenta l'espressione dei recettori delle LDL (conigli Watanabe) e attenua la mitotossicità statino-indotta (cavie). In studi clinici di fase II condotti in pazienti ipercolesterolemici, ha diminuito C-LDL, apoB e TG, aumentando il C-HDL. Mentre uno studio randomizzato ha evidenziato le proprietà del lapaquistat (50 mg/die) su C-LDL (-18,4%), apoB (-15,3%) e TG (-17,2%), un altro (fase III, randomizzato), pur confermandone l'efficacia (fino a 100 mg) in pazienti ipercolesterolemici, ha evidenziato aumenti dose-dipendenti degli enzimi epatici. Questo effetto avverso, nel 2008 ha portato all'accantonamento della molecola e, probabilmente, dell'intera classe. Altri inibitori della sintesi del colesterolo agenti su tappe a valle di quelle descritte sono analizzati nel **CD**: Approfondimento 30.1.

Biosintesi degli acidi grassi

Obesità e sindrome metabolica sono caratterizzate da alterazioni nelle vie biosintetiche e cataboliche degli acidi grassi, controllate reciprocamente dal malonil-CoA, le cui elevate concentrazioni stimolano la lipogenesi e inibiscono la beta ossidazione. Se la lipogenesi è attiva nel fegato e nel tessuto adiposo, l'ossidazione è principalmente epatica e muscolare, cuore compreso. La differenza fondamentale tra biosintesi degli acidi grassi e ossidazione (oltre ad agire in direzioni opposte in funzione dello stato metabolico) risiede nel fatto che la prima, al contrario dell'ossidazione, avviene nel citoplasma. Alcuni enzimi epatici coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi e dei TG sono anche regolati da PPAR α , recettori X, fattore nucleare epatico-4 α e SREBP-1c. Il primo passaggio nella formazione degli acidi grassi è la sintesi del malonil-CoA da bicarbonato e acetil-CoA da parte dell'acetil-CoA car-

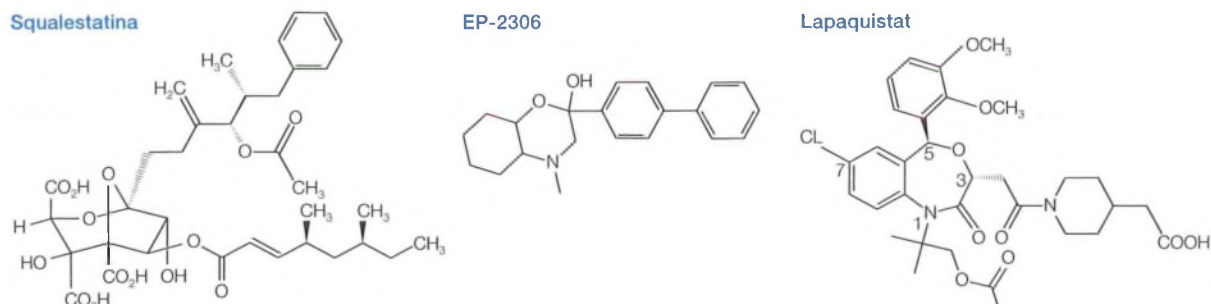


FIGURA 30.5 Struttura chimica degli inibitori della SS: squalestatina, EP-2306, lapaquistat.

bossilasi (ACC, in due isoforme), il più importante punto di regolazione della via. Gli effetti del malonil-CoA vanno dalla risposta chetogenetica epatica in stati di digiuno e di diabete, alla scelta del substrato energetico (carboidrati o grassi) da utilizzarsi nel muscolo, per finire con la stimolazione della secrezione di insulina da parte delle cellule β e con il controllo ipotalamico dell'appetito.

Sintetasi degli acidi grassi e sua inibizione

L'enzima chiave nella sintesi degli acidi grassi a lunga catena

La sintetasi degli acidi grassi (FAS) sintetizza l'acido grasso palmitato (C16:0) a lunga catena partendo da malonilCoA e acetilCoA, con consumo di 7 molecole di NADPH e 14 di ATP. La FAS, attiva in fegato, tessuto adiposo e ghiandole mammarie in allattamento, è essenziale nella fase embrionale per fornire acidi grassi e nell'adulto per regolare la conversione dei carboidrati in grassi (Figure 30.1 e 30.6) (vedi CD: Approfondimento 30.2. *Farmacologia della biosintesi degli acidi grassi*).

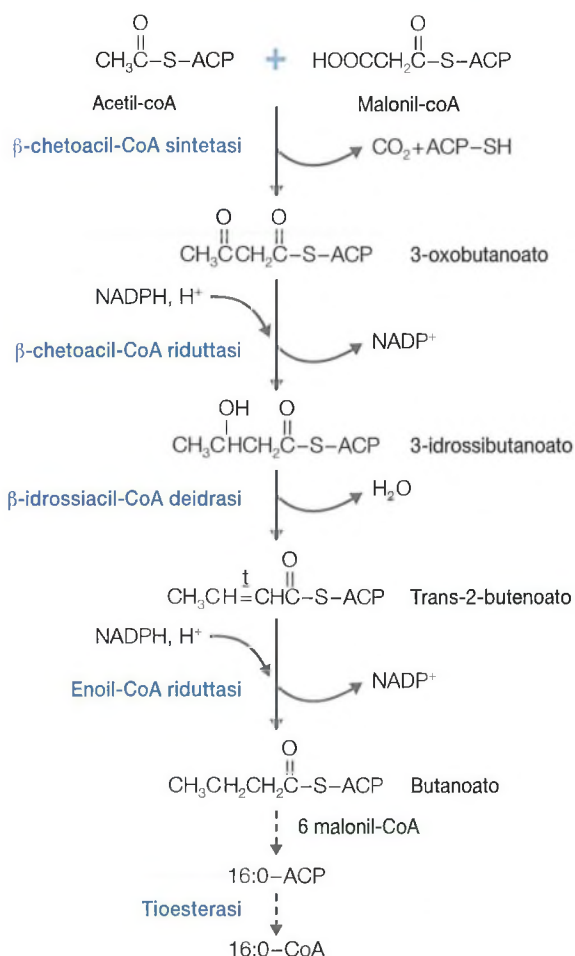


FIGURA 30.6 Schema metabolico della sintesi degli acidi grassi mediata dalla FAS. Il complesso multienzimatico FAS sintetizza l'acido grasso palmitato (C16:0) partendo da 2 molecole semplici quali malonilCoA e acetilCoA, con consumo di 7 molecole di NADPH e 14 di ATP.

L'inibitore per antonomasia della FAS è il C75 (Figura 30.7), valido farmaco antiobesità nei topi anche grazie a un suo effetto centrale (per confermare queste indicazioni sono necessarie nuove molecole per valutare in modo più specifico gli effetti dell'enzima). Al di là degli acidi grassi omega-3 (vedi CD: Approfondimento 30.3. *Farmacologia della biosintesi dei trigliceridi*) che svolgono parte dell'azione antiobesità inibendo FAS e SCD-1, sono in sviluppo molecole FAS-selettive non tossiche, quali derivati dell'orlistat e della soia, polifenoli del the verde (epigallocatechina-3-gallato) o flavonoidi (luteolina, quercetina, kaempferolo), che presentano proprietà antiobesità e antitumorali. Inoltre, dato che la sintesi degli acidi grassi in piante, batteri e microrganismi è dipendente da un diverso sistema (FAS II), l'inibizione di questa via metabolica è potenzialmente utile per la cura di malattie (ad esempio, malaria), senza danneggiare l'ospite.

Desaturasi degli acidi grassi e suoi inibitori

La desaturazione, così come l'elongazione, sono processi fondamentali nella sintesi degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena

Tra le desaturasi degli acidi grassi, (tre diverse famiglie, a seconda della posizione dell'insaturazione introdotta), la più studiata è la stearoil-CoA desaturasi (SCD), controllata da chREBP, l'enzima limitante la sintesi di acido palmitoleico e oleico rispettivamente da palmitato e stearato (Figura 30.8). Nell'uomo esistono due isoforme principali: mentre SCD-1 è particolarmente espressa in fegato e tessuto adiposo, SCD-5 è più elevata in cervello e pancreas. Per i dettagli su desaturasi ed elongasi, vedi CD: Approfondimento 30.2.

L'inibizione della SCD-1 può rappresentare un valido bersaglio nel trattamento di diabete, obesità, sindrome metabolica e steatosi epatica non alcolica, ora possibile con specifici oligonucleotidi antisense. Alopecia, disfunzioni nella funzione di barriera dell'epidermide e termoregolazione presenti nei topi SCD-1 KO, assieme ad aumento dell'aterosclerosi aortica, dell'attivazione macrofagica, delle infiammazioni intestinali e infine tossicità da accumulo di acidi grassi saturi nelle cellule β pancreatiche pongono alcuni interrogativi sulla validità dell'approccio. Dal momento che la somministrazione di inibitori della SCD-1 con acidi grassi ω -3 riduce drasticamente infiammazione e aterosclerosi, sono in studio (70 brevetti negli ultimi 5 anni) piccole molecole (piridazine, arilbenzimidazoli, tiazoli e benzoilpiperidine) specifiche e potenti nell'inibire la SCD-1, anche come antitumorali, dato che l'attività dell'enzima è significativamente aumentata nei tumori (fornitura di energia per l'aberrante crescita cellulare). Parte di tale effetto antiproliferativo sembra derivare anche dall'inattivazione dell'acetilCoA carbossilasi.

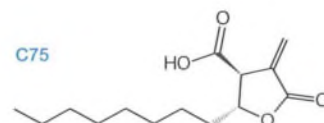


FIGURA 30.7 Struttura chimica dell'inibitore della FAS C75.

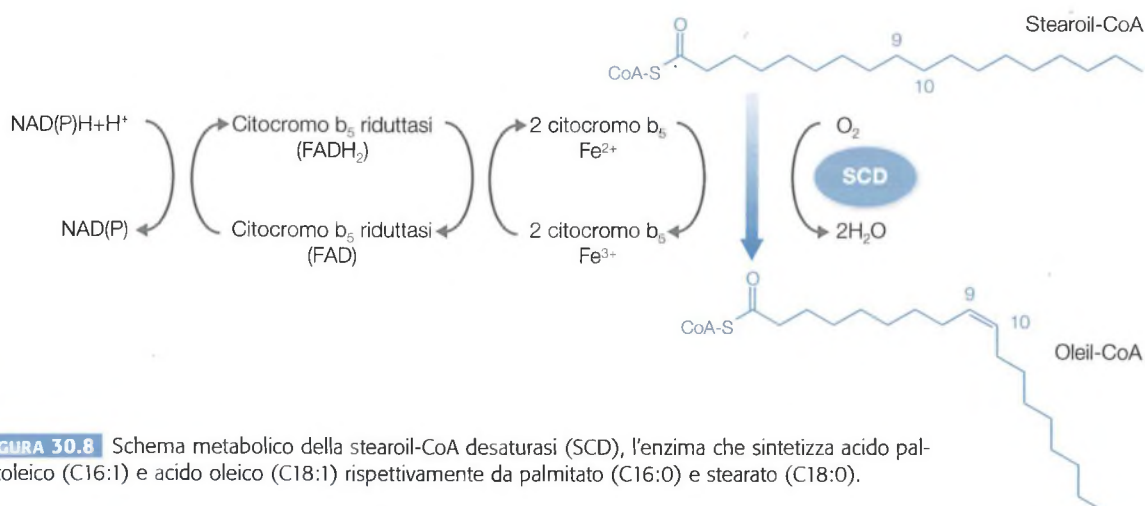


FIGURA 30.8 Schema metabolico della stearoil-CoA desaturasi (SCD), l'enzima che sintetizza acido palmitoleico (C16:1) e acido oleico (C18:1) rispettivamente da palmitato (C16:0) e stearato (C18:0).

Biosintesi dei trigliceridi

L'ipertrigliceridemia è un importante fattore di rischio per eventi cardiovascolari

Elevate concentrazioni di TG plasmatici sono particolarmente negative in associazione con insulino-resistenza, sindrome metabolica, iperlipidemia combinata, diabete e disbetalipoproteinemia. L'ipertrigliceridemia può derivare da una eccessiva assunzione di cibi grassi, da una diminuita efficienza nel loro catabolismo o da un'umentata biosintesi epatica. Parte della tossicità dei TG risiede nel fatto che, quando elevati nel plasma, vengono trasferiti in quantità dalle VLDL alle HDL e LDL da parte della CETP (vedi oltre), rendendoli bersagli preferenziali per la lipasi epatica che, a sua volta produce le lipoproteine aterogeniche LDL piccole e dense, riducendo le HDL e generando un profilo particolarmente aterogeno.

Inibitori della diacilglicerolo aciltrasferasi (DGAT)

Possono essere utili nelle dislipidemie aterogene e nella sindrome metabolica

Tutte le cellule, in particolare intestinali ed epatiche, sintetizzano TG che, oltre a fungere da riserva di energia e di acidi grassi essenziali, rimuovono l'eccesso di lipidi bioattivi potenzialmente tossici (FFA, diacilglicerolo). Essi sono sintetizzati attraverso due vie (Figura 30.9).

Delle due principali vie biosintetiche, quella del glicerolo-3-fosfato (Figura 30.9A) è attiva specialmente nel fegato e nel tessuto adiposo.

Negli enterociti (Figura 30.9B), invece, il 75% dei TG è formato dalla via del monoacilglicerolo. I 2-monoacil-sngliceroli e gli FFA rilasciati dai TG dietetici dalla lipasi pancreatica sono captati e dapprima acilati dall'acilcoenzima A:monoacilglicerolo aciltrasferasi, a formare 1,2-diacilgliceroli e, in misura minore 2,3-diacilgliceroli. In entrambe le vie metaboliche, l'ultimo passaggio è a carico della diacilglicerolo aciltrasferasi (DGAT), enzima limitante e unico dedicato alla sintesi dei TG, che vengo-

no poi internalizzati nelle VLDL. Queste caratteristiche propongono DGAT come oggetto di inibizione farmacologica in dislipidemie aterogene, sindrome metabolica e steatosi epatica; infatti il contributo della sintesi epatica nell'uomo in caso di obesità sale dal 10 al 25% e l'ipertrigliceridemia post-prandiale e a digiuno rappresenta un fattore indipendente di rischio per eventi cardiovascolari. L'eccesso di TG generati si accumula nel tessuto adiposo o, per aumentata insulino-resistenza, anche in quelli non adiposi.

DGAT esiste in due isoforme (1 e 2), con funzioni e topologia distinte (vedi CD: Approfondimento 30.3).

Vari studi suggeriscono come l'inibizione della DGAT1 umana possa ridurre obesità, sindrome metabolica, steatosi epatica e acne. Sono stati scoperti inibitori della DGAT grazie a saggi sull'enzima isolato e cellule intatte: derivati fungini come le roseline, vegetali quali xantumoli, prenilflavonoidi, derivati della salvia, della liquirizia e del ginseng (oltre al ω 3 EPA) inibiscono DGAT in vitro e in animali, ma spesso la caratterizzazione non è completa e la specificità non assoluta. L'inibizione di DGAT1 con piccole molecole ha migliorato significativamente il profilo lipidico in modelli dietetici e genetici di dislipidemia, ma si registra un notevole miglioramento anche con terapie basate su oligonucleotidi antisense verso la DGAT2 in topi obesi, dislipidemicici e in ratti steatosici. Va ricordato come gran parte dell'effetto ipolipidemizzante della niacina (vedi CD: Approfondimento 30.3) sia dovuto all'inibizione non competitiva dell'attività della DGAT2, ma non della DGAT1.

Il proliferare di brevetti di inibitori di DGAT1 dimostra la bontà dell'approccio farmacologico: varie importanti industrie farmaceutiche hanno prodotto e modificato strutture chimiche diverse tra loro, per migliorarne potenza, specificità e selettività, mentre altre hanno brevettato nucleotidi antisense per il trattamento della fibrosi epatica, inibendo DGAT1 e 2. La notevole riduzione dell'mRNA della DGAT murina (-87%) ha protetto dalla fibrosi ma non dalla steatosi, mentre la riduzione di DGAT2 epatica (-90%) ha diminuito i TG plasmatici senza migliorare la fibrosi.



GPAT: glicerolo-3-fosfato aciltrasferasi; FA-CoA: acido grasso coenzima A; AGPAT: acilglicerofosfato aciltrasferasi; PAP: fosfoidrolasi dell'acido fosfatidico; DGAT: diacilglicerolo aciltrasferasi

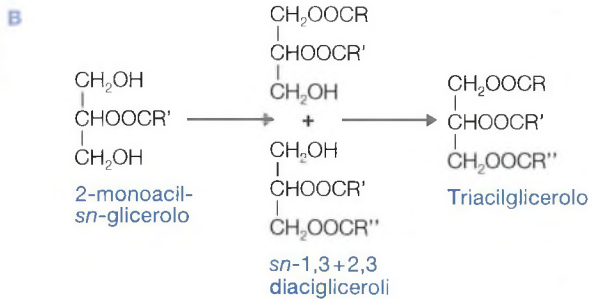


FIGURA 30.9 **A.** Via biosintetica dei TG dal monoacilglicerolo (epatica). **B.** Via biosintetica dei TG dal glicerolo-3-fosfato (intestinale).

Riassumendo, l'inibizione della DGAT1 potrebbe mitigare i rischi cardiovascolari e metabolici agendo su un solo enzima. Dagli studi preclinici ottenuti sopprimendo o sovraesprimendo DGAT1 si può prevedere che nell'uomo la riduzione di DGAT1 possa:

- ▶ migliorare la sensibilità all'insulina, con riduzione del glucosio plasmatico in pazienti diabetici di tipo 2;
- ▶ ridurre peso corporeo e resistenza all'aumento di peso indotto dalla dieta;
- ▶ migliorare il quadro lipidico plasmatico, specie nella riduzione della lipemia prandiale;
- ▶ ridurre la steatosi epatica;
- ▶ variare la secrezione di polipeptidi intestinali con diminuita assunzione di cibo.

Tra gli inibitori di DGAT1 in valutazione clinica (vedi **CD**: Approfondimento 30.3, Figura 30.3.1), LCQ-908 è utilizzato attualmente in uno studio di fase II su pazienti diabetici di tipo 2, per saggiarlo con combinazione con metformina rispetto a placebo o sitagliptina. Anche il composto PF-04620110 viene valutato in due trial di fase I (efficacia, farmacocinetica e sicurezza) in individui normali e sovrappeso-obesi. Infine, si è in attesa dei risultati ottenuti con l'inibitore AZD-7687, saggiato in due studi di fase I, in volontari sani e in pazienti sovrappeso-obesi.

Regolatori della trascrizione genica di geni coinvolti nel metabolismo lipidico

I recettori LXR e i ligandi sintetici di LXR

I recettori LXR (*Liver X Receptor*) sono membri della superfamiglia dei recettori nucleari che comprendono numerosi fattori di trascrizione attivati da un ligando e giocano un ruolo chiave nel controllo del metabolismo dei lipidi, agendo come regolatori degli acidi grassi e del colesterolo (vedi anche Capitoli 19 e 20). La regolazione degli LXR sul metabolismo del colesterolo avviene a livello:

1. dell'assorbimento intestinale;

2. della biosintesi epatica e della sua captazione;
3. dell'eliminazione mediante conversione in acidi biliari e secrezione con la bile;
4. del trasporto inverso (vedi **CD**: Approfondimento 30.4. *Ruolo dei recettori LXR sul metabolismo lipidico e interventi farmacologici*).

Oltre ai ligandi endogeni di LXR, rappresentati dagli ossisteroli 22(R)-idrossicolesterolo, 20(S)-idrossicolesterolo, 24(s),25-epossicolesterolo, sono stati sviluppati una serie di ligandi sintetici, tra cui molti sono doppi agonisti, attivando sia LXR α che LXR β , con effetti favorevoli sul metabolismo del colesterolo e sfavorevoli sul metabolismo degli acidi grassi. Tra questi, i più studiati sono i composti a struttura non steroidea, il T0901317 e il GW3965 strutturalmente distinti e con differenze nella loro azione farmacologica. La scoperta del ruolo chiave del recettore LXR sul metabolismo del colesterolo ha portato comunque a un ulteriore sviluppo di nuove entità chimiche attive sui recettori LXR per il trattamento dell'aterosclerosi. Studi di relazioni struttura-attività hanno permesso la sintesi di diversi agonisti LXR, tra cui due a struttura steroidea, il AT-829 e il DMHCA attualmente in sviluppo preclinico in grado di attivare selettivamente l'espressione di geni presenti in alcuni tessuti ma non di geni coinvolti nella lipogenesi. Infine, va ricordato il composto Riccardin C, prodotto naturale non steroideo, agonista per LXR α e antagonista LXR β .

I recettori PPAR e la loro modulazione farmacologica

I PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) sono recettori nucleari che controllano il metabolismo dei lipidi e regolano l'omeostasi dei lipidi e del glucosio. Sono state identificate tre isoforme: il PPAR α espresso nel fegato, nel rene, nei muscoli e nel tessuto adiposo; il PPAR β/δ (qui riferito come PPAR β) espresso nel cervello, nel tessuto adiposo e nella cute; il PPAR γ espresso

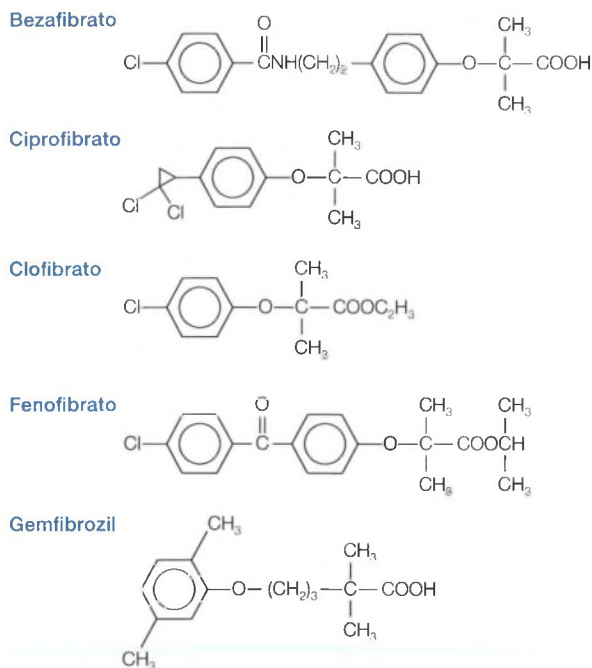


FIGURA 30.10 Struttura chimica dei fibrati.

in quasi tutti i tessuti. I proliferatori perossisomiali e gli acidi grassi sono in grado di attivare i PPAR α e PPAR β che mediano l'induzione di enzimi perossisomiali che catalizzano la β -ossidazione degli acidi grassi in fegato, muscolo scheletrico e tessuto adiposo. I PPAR γ sono invece importanti regolatori della lipogenesi epatica e del tessuto adiposo così come della risposta all'insulina per la regolazione del glucosio circolante. Pertanto, la modulazione farmacologica di differenti sottotipi recettoriali tessuto-specifica può portare a nuove strategie terapeutiche per il controllo delle dislipidemie e del diabete (vedi **CD**: Approfondimento 30.4).

PPAR α agonisti: i fibrati

I PPAR α e i PPAR γ sono i bersagli molecolari di diversi farmaci tra i quali i fibrati, attivatori dei PPAR α e i tiazolidinedioni, attivatori dei PPAR γ . I fibrati (Figura 30.10) sono una classe di ipolipemizzanti utilizzati principalmente per correggere l'ipertrigliceridemia, ma sembrano anche possedere attività antinfiammatorie e antitrombotiche, contribuendo alla riduzione di eventi cardiovascolari. Una metanalisi su studi clinici controllati verso placebo condotti con fibrati ha dimostrato un loro effetto significativo nella riduzione del colesterolo totale (-8%), dei TG (-30%) e nell'aumento del C-HDL (+9%). La modesta riduzione del C-LDL (-9%) varia da un aumento del 10% in iperlipidemia mista e ipertrigliceridemia a una riduzione fino al 20% in ipercolesterolemici puri. Una metanalisi condotta nel 2010 su studi clinici dal 1950 in poi ha inoltre permesso di evidenziare un effetto benefico dei fibrati in eventi cardiovascolari maggiori, prevenendo eventi coronarici.

PPAR γ agonisti: tiazolidinedioni

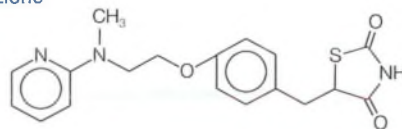
Approvati a partire dal 1990 nella terapia aggiuntiva a quella del diabete mellito di tipo 2 e delle patologie associate, in clinica sono stati utilizzati rosiglitazone, pioglitazone e troglitazone (Figura 30.11).

Oltre a ridurre il glucosio plasmatico, la terapia con tiazolidinedioni migliora le dislipidemie, in quanto attiva selettivamente i recettori nucleari PPAR γ e modula la trascrizione di geni sensibili all'insulina coinvolti nel controllo del metabolismo del glucosio e dei lipidi. Infatti, pioglitazone e rosiglitazone hanno acquisito crescente interesse nella terapia di pazienti diabetici a elevato rischio cardiovascolare. Il pioglitazone, in presenza o in assenza di terapia concomitante antidiabetica, riduce TG, colesterolo totale, C-LDL e aumenta il C-HDL in pazienti dislipidemici. Sia come monoterapia che in associazione, sembra essere associato a un aumento dei benefici sul profilo lipidico rispetto al rosiglitazone. Inoltre, risultati dello studio clinico "PROactive" dimostrano un'incoraggiante riduzione del 16% degli eventi combinati di morte, infarto miocardico non fatale e ictus non fatale dopo trattamento con pioglitazone, rispetto a placebo, effetto di grande interesse per lo sviluppo di doppi agonisti PPAR α/γ . Tuttavia, questi benefici dei tiazolidinedioni non sono tali da farli considerare farmaci di prima scelta nelle dislipidemie.

Agonisti doppi PPAR α/γ

Come atteso, essi presentano elevata efficacia rispetto ad agonisti specifici PPAR γ , migliorando contemporaneamente l'omeostasi del glucosio e dei lipidi, sebbene il loro sviluppo clinico sia stato bloccato a causa di un aumento dei livelli di creatinina sierica, della diminuzione della filtrazione glomerulare (tesaglitazar) e dell'aumento del rischio di eventi cardiovascolari (muraglitazar). Tuttavia, dato che gli effetti collaterali sembrano peculiari per ogni composto e non associati alla classe terapeutica, è verosimile che vi possa essere spazio per lo sviluppo di nuovi agonisti con un migliore profilo di sicurezza. Ad esempio, aleglitazar è un agonista doppio PPAR α/γ bilanciato disegnato per ottimizzare i benefici sul quadro lipidico e glicemico e minimizzare gli effetti sull'aumento di peso e sull'edema (Figura 30.12). Studi preclinici hanno mostrato un effetto favorevole di aleglitazar su

Rosiglitazone



Pioglitazone

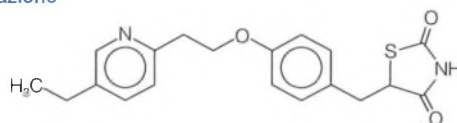


FIGURA 30.11 Struttura chimica dei tiazolidinedioni.

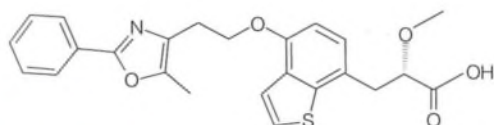


FIGURA 30.12 Struttura chimica del doppio agonista PPAR α/γ aleglitazar.

glicemia, risposta all'insulina e alla dislipidemia, rispetto al rosiglitazone, con un profilo generale rassicurante di tossicità emerso dagli studi di sicurezza preclinica. Lo studio di fase II SYNCHRONY, condotto con un gruppo placebo e con pioglitazone ha mostrato un'efficacia di aleglitazar sul controllo della glicemia simile a quello del pioglitazone, ma un migliore profilo lipidico (in particolare una riduzione del C-LDL, che aumenta invece moderatamente con pioglitazone). Inoltre uno di questi farmaci, il troglitazone, è stato ritirato dal mercato per l'aumento di incidenza di epatiti.

Proteine di trasferimento dei lipidi

Il trasporto plasmatico del colesterolo e dei TG richiede la risoluzione di due problemi fondamentali: rendere solubili in un mezzo acquoso molecole altamente lipofile; trasportare questi lipidi ai tessuti. Il primo problema è risolto dalla presenza nel plasma di complessi macromolecolari chiamati lipoproteine (vedi **CD**: Approfondimento 30.5. *Le lipoproteine*), caratterizzate da una porzione lipidica composta da colesterolo libero ed esterificato, fosfolipidi e trigliceridi, e da una componente proteica (apolipoproteine). Per accomodare questi componenti, le lipoproteine sono strutturate come particelle sferiche ricoperte da uno strato di fosfolipidi orientati con le porzioni idrofile verso il mezzo acquoso e quelle idrofobe verso il centro e da una serie di apolipoproteine che sono in grado da una parte di interagire con i fosfolipidi e dall'altra con il mezzo acquoso. Mentre il colesterolo libero è in superficie, i lipidi più apolari (TG e colesterolo esterificato), sono in gran parte localizzati al centro della struttura lipoproteica. Questa organizzazione permette quindi alle lipoproteine di essere stabili nel plasma e al contempo di veicolare molecole apolari. Ne consegue che, a un aumento dei lipidi plasmatici, corrisponde un aumento delle lipoproteine circolanti.

Il secondo obiettivo, ovvero il trasporto tessutale dei lipidi, è raggiunto da una parte attraverso l'interazione delle lipoproteine ricche in TG con enzimi lipolitici presenti nell'endotelio vasale e con proteine di trasporto, e dall'altra, tramite l'interazione con recettori specifici che promuovono la rimozione dal circolo di alcune lipoproteine o di loro componenti, modulandone in tal modo le concentrazioni circolanti.

Progressi fondamentali sono stati ottenuti dopo le scoperte di vari recettori (per le LDL, scavenger, per i remnants, per le B-VLDL e per le HDL) oltre alla *LDL Receptor related Protein* (LRP).

Verranno trattati brevemente alcuni enzimi deputati al trasferimento dei lipidi, dato il loro attuale interesse farmacologico: in particolare acil-CoA-colesterolo aciltrasferasi (ACAT), la proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP), la proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi (MTP).

Per dettagli su altri enzimi e sugli inibitori farmacologici, vedi **CD**: Approfondimento 30.6. *Proteine di trasferimento dei lipidi*.

Acil-coenzima A-colesterolo aciltrasferasi e suoi inibitori

L'acil-coenzima A-colesterolo aciltrasferasi (ACAT) è un enzima integrale di membrana che catalizza la formazione dei CE da colesterolo libero e acidi grassi a lunga catena attivati.

Contribuisce a trasformare macrofagi e cellule muscolari lisce in cellule schiumose di parete, aumentando il rischio di aterosclerosi, ma riducendo l'accumulo di colesterolo libero, potenzialmente tossico.

È essenziale nella formazione delle lipoproteine contenenti apoB. Chilomicroni, remnants delle VLDL e LDL trasportano i CE sintetizzati dall'ACAT intestinale ed epatica.

Nell'intestino tenue ACAT promuove l'assorbimento del colesterolo, creando un gradiente di diffusione attraverso la membrana dell'enterocita.

Esistono due isoforme nei mammiferi (ACAT1 e ACAT2), regolate da meccanismi di traduzione e post-traduzionali. Mentre ACAT1 è ubiquitaria nei mammiferi, ACAT2 è predominante in fegato e intestino, con un importante ruolo nell'assorbimento intestinale e nella formazione delle lipoproteine epatiche (vedi **CD**: Approfondimenti 30.5 e 30.6).

Negli anni 1980-1995 sono stati sviluppati inibitori non selettivi dell'ACAT per bloccare l'esterificazione del colesterolo nei macrofagi e diminuire la formazione di CE intestinali ed epatici, riducendo così le lipoproteine contenenti apoB. Gli inibitori sono classificati in: derivati anilidici di un acido grasso; derivati dell'urea (447C88, glibenclamide); a elevata solubilità (avasimibe).

Nel primo caso annoveriamo i composti CI-976 ma soprattutto l'eflucimibe, che diminuisce il colesterolo plasmatico in animali ipercolesterolemici con potenza superiore rispetto agli altri inibitori e riduce in conigli ipercolesterolemici strie lipidiche, disfunzione endoteliale, lesioni (-50%) e accumulo di macrofagi nell'aorta. Purtroppo, non sono ancora disponibili risultati clinici. I derivati dell'urea, pur non particolarmente efficaci in vivo, sono degni di menzione in quanto capistipite dei derivati a più elevata solubilità. Tra questi, l'avasimibe in vitro inibisce la captazione delle LDL modificate e aumenta il trasporto inverso del colesterolo, riducendo la formazione delle cellule schiumose. Modelli animali ne hanno documentato sicurezza ed effetti antiaterosclerotici, ma nell'uomo non sono state confermate la diminuzione del colesterolo non-HDL e la riduzione nel volume della placca, portando all'abbandono della molecola. Il pactimibe, l'altro inibitore non selettivo dell'ACAT, nello studio

ACTIVATE ha addirittura provocato una progressione del volume della placca rispetto ai controlli, portando all'abbandono dello sviluppo della molecola e alla sospensione precoce degli studi clinici in corso. Le spiegazioni di questi risultati negativi sono in parte dovute al basso dosaggio, alla differenza nei ruoli di ACAT tra animale e uomo, ma soprattutto al fatto che l'inibizione aspecifica di ACAT diminuisce il trasporto inverso del colesterolo (destabilizzando ABCA1) e aumenta colesterolo libero, apoptosi ed espressione di geni proinfiammogeni. Gli inibitori selettivi di ACAT2, tra cui gli oligonucleotidi anti ACAT2, hanno dato risultati positivi in modelli animali di aterosclerosi e potrebbero risultare sia atero- che epatoprotettori nell'uomo, a patto che raggiungano concentrazioni efficaci e che ne siano verificate sicurezza ed efficacia. Nuove prospettive si aprono dall'analisi di derivati naturali (beauveriolidi) che inibiscono in vitro preferenzialmente ACAT1. Siccome saggi condotti in topi LDL-R KO e apoE KO hanno dimostrato come queste molecole riducano le lesioni ateromasiche senza apparenti effetti collaterali, si stanno effettuando modifiche sulle loro strutture per giungere a inibitori ACAT1 o ACAT2 altamente selettivi (Figura 30.13).

Proteina di trasferimento degli esteri del colesterolo (CETP) e suoi inibitori

Un nuovo promettente approccio farmacologico per aumentare il C-HDL

La CETP, secreta soprattutto nel fegato e legata alle HDL nel torrente circolatorio, facilita il trasferimento di lipidi tra lipoproteine per:

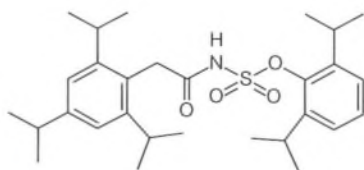
- omoscambio, movimento bidirezionale dello stesso lipide tra lipoproteine;

- eteroscambio, trasferimento netto di massa di CE dalle HDL a VLDL ed LDL (con conseguente formazione di LDL piccole e dense, altamente aterogene) e di TG dalle VLDL a LDL e HDL (creazione di HDL a emivita più breve ma più efficaci nel promuovere il trasporto inverso del colesterolo; vedi CD: Approfondimenti 30.5 e 30.6).

La CETP acquisisce lipidi neutri da una particella donatrice trasportandoli nella fase acquosa e convogliandoli alla lipoproteina accettrice mediante: suo legame con le lipoproteine; scambio dei lipidi all'interfaccia CETP-lipoproteina; trasferimento dei lipidi neutri e dei fosfolipidi e, infine, rilascio delle lipoproteine assemblate. La CETP è espressa solamente in alcune specie animali (conigli, tacchini, polli, uomo), soggette ad aterosclerosi inducibile con la dieta. L'elevata attività di CETP in pazienti dislipidemiche, con sindrome metabolica e ipertrigliceridemia, si associa ad aumentato rischio di patologie coronariche e correla con diminuzioni nelle HDL, aumenti in LDL, progressione dell'aterosclerosi e riduzioni nelle dimensioni delle HDL e delle LDL.

Torcetrapib, anacetrapib e dalcetrapib (Figura 30.14) sono gli inibitori della CETP giunti in clinica e che agiscono formando un complesso CETP-HDL. Al contrario dei primi due che bloccano l'attività enzimatica, il dalcetrapib la modula solamente, ma si lega alla CETP in modo covalente e irreversibile. Anche nucleotidi antisense a bersaglio epatico o vaccinazioni hanno sortito effetti benefici in animali con elevata espressione di CETP, tanto che sicurezza e immunogenicità del vaccino sono già state saggiate anche nell'uomo. Anche il torcetrapib, tuttavia (vedi CD: Approfondimento 30.6. *Proteine di trasferimento dei lipidi*) non ha dato in chimica risultati positivi. Il dalcetrapib inibisce l'attività della CETP in

Avasimibe



Pactimibe

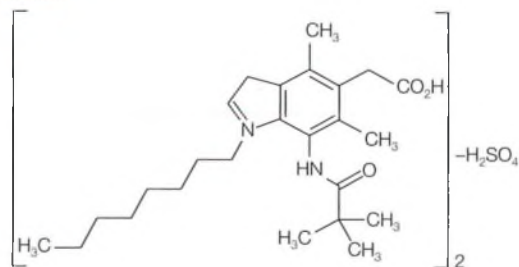
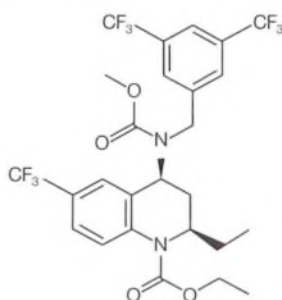
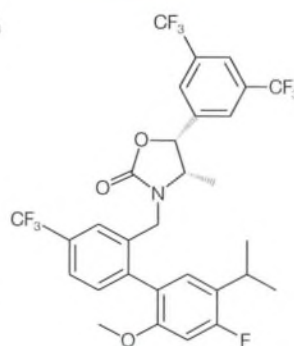


FIGURA 30.13 Struttura chimica degli inibitori dell'ACAT avasimibe e pactimibe.

Torcetrapib



Anacetrapib



Dalcetrapib

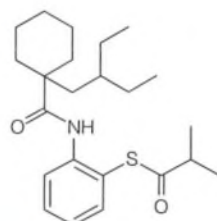


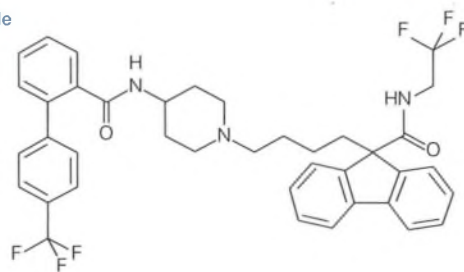
FIGURA 30.14 Struttura chimica degli inibitori della CETP torcetrapib, anacetrapib e dalcetrapib.

uomo, conigli, criceti, macachi e marmotte e, somministrato per os in animali normolipidemic, aumenta il C-HDL e diminuisce il rapporto C non-HDL/C-HDL. La sua efficacia e sicurezza sono state valutate in vari studi clinici e i dati ottenuti dagli studi clinici dal-VESSEL e dal-PLAQUE sono sicuramente incoraggianti (vedi CD: Approfondimento 30.6). Da ultimo, anacetrapib aumenta in modo marcato le HDL, migliorandone la funzionalità, senza inibire il citocromo P450: in associazione con simvastatina è sicuro e con benefici additivi sul C-LDL (vedi CD: Approfondimento 30.6). Nello studio DEFINE in pazienti con, o a rischio di eventi coronarici, già trattati con statina, anacetrapib ha diminuito il C-LDL (-39,8%), aumentando il C-HDL (138,1%). Il cambiamento del profilo lipidico si completa con una diminuzione significativa del C-non HDL, della apoB e con un aumento della apoAI (Figura 30.14).

La proteina microsomiale di trasferimento dei trigliceridi (MTP) e suoi inibitori

Un diverso approccio per diminuire il C-LDL consiste nell'agire sulla MTP, fondamentale nell'assemblaggio e nella secrezione delle lipoproteine contenenti l'apoB (chilomicroni intestinali e VLDL epatiche), in quanto media il trasporto di CE e TG verso le apoB nascenti. Anche il flavonoide naringenina inibisce la MTP, bloccando la secrezione della apoB. Date queste premesse, i pazienti adatti per l'utilizzo di inibitori della MTP (da soli o in combinazione) sono quelli con sindrome metabolica, diabete mellito di tipo 2, iperlipidemia familiare combinata e ipercolesterolemia familiare omo- ed

Lomitapide



Implitapide

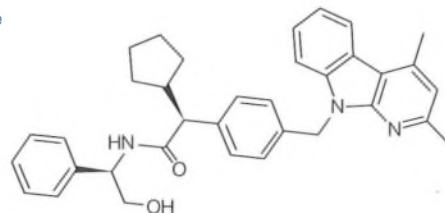


FIGURA 30.15 Struttura chimica degli inibitori della MTP lomitapide e implitapide.

eterozigote. Studi in vitro e in vivo hanno documentato come l'estratto di aglio fresco riduca l'mRNA della MTP nell'intestino, suggerendo come il suo effetto ipolipidizzante sia, almeno in parte, dovuto all'inibizione di questo enzima. Nelle fasi precliniche sono state studiate piccole molecole (CP-346086, BMS-201038, implitapide, lomitapide (Figura 30.15), JTT-130 e SLx-4090 (vedi CD: Approfondimento 30.6) e oligonucleotidi antisenso che hanno significativamente ridotto C-LDL e TG plasmatici, ma il loro impiego è impedito dalla potenziale azione steatotica epatica (Figura 30.15).

TAKE HOME MESSAGE

- Gli sviluppi della biochimica e della farmacologia hanno consentito una visione più completa e dettagliata del metabolismo dei lipidi, permettendo l'identificazione di nuovi bersagli e conseguenti approcci terapeutici.
- Tra le varie classi di farmaci, le statine rappresentano sicuramente un caposaldo terapeutico, essendosi dimostrate efficaci e sicure nella terapia delle ipercolesterolemie e nel controllo del rischio cardiovascolare.
- Al di là delle statine, sicuramente il controllo farmacologico della sintesi degli acidi grassi, dei trigliceridi, della trascrizione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico e infine delle proteine di trasferimento dei lipidi può rivelarsi un valido approccio nel trattamento delle dislipidemie e della sindrome metabolica.
- Alla luce delle esigenze cliniche e delle patologie (tumori inclusi) in cui il metabolismo dei lipidi è coinvolto in modo preponderante, è comunque indispensabile che emergano molecole innovative in grado di fornire un controllo terapeutico efficace, sicuro e completo.

Bibliografia essenziale

- ▶ Arnaboldi L, Baetta R, Ferri N et al. Inhibition of smooth muscle cell migration and proliferation by statins. *Immun Endoc Metab Agents Med Chem* 2008;8:122-40.
- ▶ Birch AM, Buckett LK, Turnbull AV. DGAT1 inhibitors as anti-obesity and anti-diabetic agents. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2010;13:489-96.
- ▶ Chen HC, Farese RV Jr. Inhibition of triglyceride synthesis as a treatment strategy for obesity: lessons from DGAT1-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:482-6.
- ▶ Davidson MH. Novel nonstatin strategies to lower low-density lipoprotein cholesterol. *Curr Atheroscler Rep* 2009;11:67-70.
- ▶ Elsayed RK, Evans JD. Emerging lipid-lowering drugs: squalene synthase inhibitors. *Expert Opin Emerg Drugs* 2008;13:309-22.
- ▶ Harris WS, Bulchandani D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr Opin Lipidol* 2006;17:387-93.
- ▶ Kamanna VS, Kashyap ML. Mechanism of action of niacin. *Am J Cardiol* 2008;101(8A):20B-26B.
- ▶ King AJ, Judd AS, Souers AJ. Inhibitors of diacylglycerol acyltransferase: a review of 2008 patents. *Expert Opin Ther Pat* 2010;20:19-29.
- ▶ Kuhajda FP. Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway. *Cancer Res* 2006;66:5977-80.
- ▶ Kusunoki JA, Kanatani, Moller DE. Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine* 2006;29:91-100.
- ▶ Lalloyer F, Staels B. Fibrates, glitazones, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:894-9.
- ▶ Lupu R, Menendez JA. Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators? *Endocrinology* 2006;147:4056-66.
- ▶ Matsuda D, Tomoda H. DGAT inhibitors for obesity. *Curr Opin Investig Drugs* 2007;8: 836-41.
- ▶ Meuwese MC, Franssen R, Stroes ES, Kastelein JJ. And then there were acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase inhibitors. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:426-30.
- ▶ Quintao EC, Cazita PM. Lipid transfer proteins: past, present and perspectives. *Atherosclerosis* 2010;209:1-9.
- ▶ Ratni H, Wright MB. Recent progress in liver X receptor-selective modulators. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2010;13:403-13.
- ▶ Rozman D, Monostory K. Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. *Pharmacol Ther* 2010;127:19-40.
- ▶ Russell RG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 2008;19:733-59.
- ▶ Saggerson D. Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr* 2008;28:253-72.
- ▶ Toutouzas K, Drakopoulou M, Skoumas I, Stefanadis C. Advancing therapy for hypercholesterolemia. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11:659-72.
- ▶ Weber O, Bischoff H, Schmeck C, Böttcher MF. Cholesteryl ester transfer protein and its inhibition. *Cell Mol Life Sci* 2010;67:3139-49.
- ▶ <http://lipidlibrary.aocs.org>

Il controllo farmacologico del metabolismo glucidico

CAPITOLO

31

Paolo Moghetti, Giacomo Zoppini

Obiettivi formativi

- ▀ Conoscere i principali meccanismi di controllo dell'omeostasi glucidica
- ▀ Conoscere i meccanismi di regolazione della secrezione insulinica
- ▀ Conoscere i meccanismi d'azione dei farmaci impiegati nella cura del diabete mellito

Il glucosio è un substrato energetico fondamentale e lo è in particolare per alcune cellule e tessuti di importanza vitale per l'organismo, quali il sistema nervoso, i globuli rossi e i leucociti. Il ruolo chiave di questo substrato discende dalla sua capacità di poter fornire energia in tempi rapidissimi ed, entro certi limiti, anche in condizioni di carenza di ossigeno. Queste proprietà uniche conferiscono al glucosio un'importanza che trascende i limiti di essere un substrato meno redditizio di altri, in termini di calorie prodotte per molecola, e di essere depositato nell'organismo (sotto forma di glicogeno) in quantità relativamente limitate. La rilevanza del ruolo e i limiti di disponibilità spiegano perché esista una gerarchia nell'utilizzo di questo substrato. Nei tessuti vitali l'accesso al glucosio prescinde da regolazioni ormonali ed è condizionato solo dai suoi livelli in circolo. Negli altri tessuti l'accesso al glucosio è invece variabile e strettamente dipendente dalla regolazione ormonale. Una fine regolazione omeostatica della glicemia è pertanto di importanza cruciale.

Il controllo della glicemia

La glicemia è soggetta a un fine controllo omeostatico multifattoriale a feed-back, integrato a livelli superiori

I fattori endocrini che concorrono a mantenere costante la glicemia sono molteplici. L'insulina svolge una funzione centrale in questa regolazione, attraverso il suo potente effetto ipoglicemizzante. La secrezione di questo ormone è a sua volta strettamente regolata a feed-back positivo dalle variazioni della glicemia. La secrezione di insulina aumenta prontamente quando la glicemia tende a salire, mentre si riduce quando vi è un calo, anche lieve, dei livelli circolanti di glucosio. A contrastare

l'azione insulinica sulla glicemia vi sono diversi ormoni iperglicemizzanti, che per tale proprietà vengono definiti controinsulari. Fra questi vanno annoverati soprattutto adrenalina, glucagone, cortisolo e GH. Sia l'insulina che gli ormoni controinsulari hanno comunque numerosi altri effetti, oltre quello sulla glicemia, e anche questi effetti sono spesso, ma non sempre, di segno opposto. Il nucleo ventro-mediale dell'ipotalamo sembra l'area di maggiore importanza nell'integrazione della risposta ormonale all'ipoglicemia, che probabilmente vede comunque coinvolti diversi altri siti del sistema nervoso centrale.

L'azione ipoglicemizzante dell'insulina risulta da uno stimolo alla captazione e al metabolismo del glucosio nei tessuti sensibili a questo ormone, muscolo in primo luogo, ma anche da una inibizione della produzione endogena, soprattutto da parte del fegato, di questo substrato. Sotto l'azione ormonale, all'interno delle cellule insulino-dipendenti il glucosio può essere immediatamente utilizzato per produrre energia. L'insulina, inoltre, inibisce la lipolisi e la chetogenesi, modula il metabolismo proteico, con un'azione complessiva di tipo anabolico, e ha importanti effetti anche sul sistema cardiovascolare.

Gli ormoni controinsulari contrastano la caduta glicemica con molteplici meccanismi

L'apparente ridondanza del sistema endocrino controregolatore è espressione dell'importanza per la sopravvivenza che hanno i meccanismi atti a impedire la caduta della glicemia. Il difetto di uno degli ormoni controinsulari può essere infatti vicariato dagli altri ormoni iperglicemizzanti, anche se tale capacità di compenso non è assoluta.

I meccanismi con cui i vari ormoni controinsulari si oppongono alla caduta della glicemia sono diversi e specifici. Il glucagone esplica il suo effetto anti-insulinico soprattutto a livello epatico. In questo organo incrementa

la produzione endogena di glucosio, attraverso uno stimolo sulla glicogenolisi e sulla gluconeogenesi, e favorisce la conversione degli acidi grassi in corpi chetonici. Il ruolo del glucagone è di importanza fondamentale nella risposta all'ipoglicemia acuta.

Le catecolamine agiscono a svariati livelli, modulando anche la secrezione di tutti gli altri ormoni coinvolti nella glicoregolazione. I loro effetti sono rapidissimi e comprendono la riduzione della sensibilità tissutale all'insulina e un potente stimolo alla lipolisi. Gli effetti di modulazione metabolica, diretta e indiretta, delle catecolamine si integrano con i loro effetti emodinamici e rendono conto del ruolo fondamentale di questi ormoni nell'adattamento dell'organismo alle perturbazioni dell'omeostasi.

Il cortisolo esplica i suoi effetti metabolici soprattutto a livello muscolare, ove stimola il catabolismo proteico con rilascio di amminoacidi che costituiscono un substrato per la gluconeogenesi epatica. Ha inoltre un effetto favorente alla lipolisi, anche se differenziato a seconda della sede corporea. Il GH, infine, contrasta l'azione dell'insulina riducendo la captazione e il metabolismo del glucosio nei tessuti periferici e stimolando la lipolisi. Il GH favorisce, inoltre, la sintesi proteica e la proliferazione cellulare.

L'effetto lipolitico di molti degli ormoni controinsulari ha importanti riflessi sul metabolismo glucidico. Esiste infatti una competizione per i processi ossidativi fra glucosio e acidi grassi liberi (FFA) e l'aumentata disponibilità di questi ultimi induce un ridotto utilizzo del glucosio e una ridotta sensibilità tissutale all'azione insulinica. Questo meccanismo sembra rivestire grande importanza nelle condizioni di insulinoresistenza.

Per ulteriori approfondimenti sui vari ormoni controinsulari, vedi CD: Approfondimento 31.1. Il sistema degli ormoni controinsulari.

Il trasporto del glucosio

Il trasporto transmembrana del glucosio è un processo altamente regolato

L'utilizzo cellulare del glucosio richiede il suo passaggio preliminare attraverso la membrana plasmatica. Questo passaggio può avvenire contro gradiente di concentrazione,

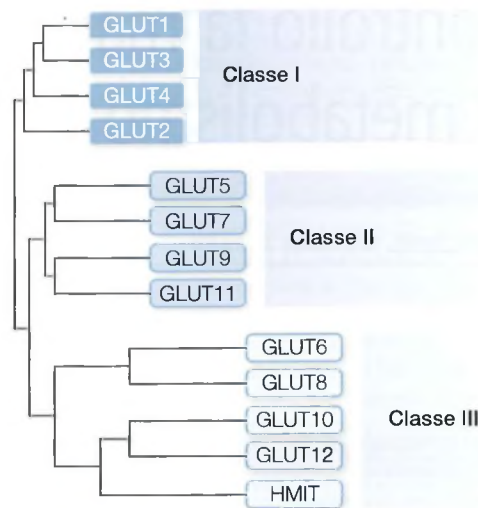


FIGURA 31.1 Famiglia dei trasportatori del glucosio. I trasportatori sono raggruppati in diverse classi, sulla base delle loro caratteristiche molecolari.

ne, come avviene nella parte apicale delle cellule epiteliali deputate ai processi di assorbimento intestinale e riassorbimento renale, mediante un processo attivo operato da un gruppo di almeno 6 differenti trasportatori Na-dipendenti, denominati SGLT. Il passaggio transmembrana del glucosio con finalità metaboliche avviene invece secondo gradiente, attraverso un processo di trasferimento bidirezionale facilitato del substrato (energia-indipendente) mediato da una numerosa famiglia di proteine glicosilate, che hanno affinità per il glucosio e per altri polioli e di cui al momento sono stati identificati 14 membri, denominati GLUT(1-14) e HMIT1 (H⁺-myo-inositol cotransporter o GLUT 13), raggruppati in 3 classi sulla base delle loro caratteristiche molecolari (Figura 31.1). Queste proteine, di circa 500 amminoacidi, appartengono alla superfamiglia dei facilitatori maggiori (MFS, *Major Facilitator Superfamily*) e sono tutte caratterizzate da 12 domini transmembrana, con entrambi gli estremi, amminoterminale e carbossiterminale, sul lato interno della membrana e una catena oligosaccaridica extracellulare (Figura 31.2). Tali strutture

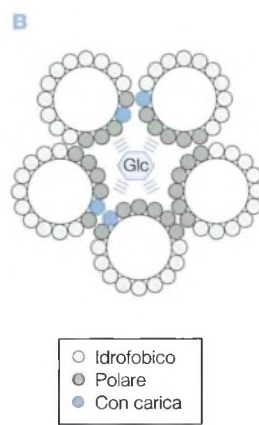
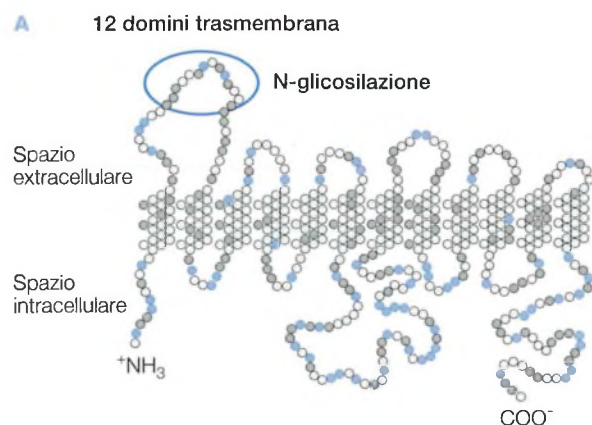


FIGURA 31.2 **A.** Le proteine appartenenti alla famiglia dei GLUT hanno una struttura caratterizzata da 12 domini transmembrana e da una catena oligosaccaridica extracellulare. **B.** Rappresentazione della configurazione spaziale del trasportatore, con associazione di 5 eliche anfipatiche. La parte polare è orientata verso la cavità interna. Il glucosio può interagire con la proteina mediante ponti idrogeno.

TABELLA 31.1 Distribuzione e caratteristiche dei GLUT*

Trasportatore	Distribuzione tissutale	Caratteristiche
GLUT 1	SNC (microcircolo), eritrociti	Alta capacità, affinità relativamente alta
GLUT 2	β -cellula, fegato	Alta capacità, bassa affinità; trasporta anche fruttosio
GLUT 3	SNC (neuroni)	Alta capacità, alta affinità
GLUT 4	Muscolo, tessuto adiposo, miocardio	Traslocazione alla superficie cellulare e attività modulate da insulina/esercizio fisico
GLUT 5	Intestino, rene, testicolo	Trasporta selettivamente fruttosio
GLUT 6	SNC, leucociti	Traslocazione alla superficie cellulare non modulata da insulina
GLUT 7	??	
GLUT 8	SNC, testicolo	Modulato nel testicolo da hCG, IGF e citochine; responsivo a insulina e glicemia (?)
GLUT 9	Fegato, rene, placenta, leucociti	Bassa affinità
GLUT 10	Fegato, pancreas	Polimorfismo genetico associato a insulinemia
GLUT 11	Muscolo, miocardio	Trasporto del glucosio inibito dal fruttosio; espresso selettivamente in fibre lente
GLUT 12	Prostata, miocardio, placenta, ghiandola mammaria	
HMIT 1	SNC trasporta selettivamente mioinositolo	

*I trasportatori codificati dai geni della famiglia SLC2A (solute carriers 2A) sono costituiti da proteine (indicate con la sigla GLUT) che trasportano secondo gradiente il glucosio e altri polioli attraverso la membrana plasmatica. Esse differiscono per specificità di substrato, distribuzione tissutale e altre caratteristiche. I membri di questa famiglia meglio conosciuti sono i primi 4. Negli ultimi anni sono stati identificati altri membri di questa famiglia, ma le loro caratteristiche non sono ancora state delineate con precisione.

differiscono per specificità di substrato (non tutte trasportano glucosio), proprietà cinetiche e distribuzione tissutale (Tabella 31.1).

GLUT1 è espresso soprattutto negli eritrociti e nell'endotelio della barriera ematoencefalica. GLUT3 è il principale trasportatore nei neuroni a livello sia dei dendriti che degli assoni. Inoltre, GLUT 3 è espresso nelle cellule del sistema immunitario (linfociti, monociti/macrofagi) dove è localizzato in vescicole citoplasmatiche che a seguito di uno stimolo, ancora non ben definito, traslocano alla membrana plasmatica. La comprensione di questo meccanismo di attivazione potrebbe contribuire a chiarire i meccanismi di attivazione cellulare immunitaria e infiammatoria. Questi due trasportatori sono pertanto fondamentali nel consentire il trasporto del glucosio nei tessuti vitali.

GLUT2 è presente nella β -cellula pancreatica, dove partecipa al processo di modulazione del rilascio di insulina, e nel fegato. La principale caratteristica di questo trasportatore è la sua elevata K_m (circa 17 mM) che permette di ottenere l'equilibrio tra il glucosio extra- e intracellulare in un ampio range di glicemia, normale e diabetica. In questi tessuti il passaggio limitante del metabolismo del glucosio diviene la sua fosforilazione in posizione 6. In genere le concentrazioni intracellulari di glucosio libero sono molto basse e per questo il trasporto procede sempre verso l'interno della cellula. Nei tessuti che esplicano neoglucogenesi (fegato e rene), in opportune condizioni, il trasporto può avvenire anche in senso opposto. Il trasportatore GLUT2 partecipa alla regolazione glucosio-dipendente della funzione β -cellulare pancreatica. Questo trasportatore rende possibile una relazione proporzionale fra glicemia e rilascio di insulina fino a valori glicemici intorno a 10-12 mM.

GLUT4 è il trasportatore modulato dall'insulina, ma anche dalla contrazione muscolare.

Il sistema dell'insulina

Il rilascio di insulina viene modulato fisiologicamente attraverso un processo calcio-dipendente, attivato dal metabolismo del glucosio nella β -cellula

Lo stimolo glicemico al rilascio di insulina è un processo complesso, che comprende anche la fosforilazione e la metabolizzazione del glucosio all'interno della β -cellula, la conseguente formazione di ATP, con aumento del rapporto ATP/ADP, e l'inibizione di canali del potassio ATP-dipendenti, con depolarizzazione della membrana. Questa a sua volta induce l'apertura di canali del calcio voltaggio-dipendenti, con aumento della $[Ca^{2+}]_i$ e conseguente fusione dei granuli di deposito intracellulari contenenti l'insulina preformata con la membrana citoplasmatica (Figura 31.3). In questo processo la tappa limitante sembra essere la fosforilazione del glucosio a opera della glucochinasi. Quest'ultima andrebbe dunque considerata il vero sensore del glucosio. Alla secrezione rapida dell'insulina preformata fa seguito l'attivazione della neosintesi di questo ormone.

L'insulina viene secreta in maniera pulsatile con picchi a elevata frequenza, ogni 10-15 minuti, e altri a frequenza minore. Gli stimoli secretagoghi incrementano l'ampiezza dei singoli picchi secretori. I meccanismi alla base di questo pattern secretorio sono in larga parte ancora sconosciuti, ma l'integrità di questo fenomeno sembra rilevante per l'efficacia biologica dell'insulina.

Il catabolismo dell'insulina è molto rapido ($t_{1/2}$ circa 4 minuti) e avviene soprattutto a livello epatico. Il processo sembra avvenire in buona parte mediante endocitosi dei complessi ormone-recettore.

L'aumento dell'AMP ciclico, indotto dal glucagone e da altri ormoni gastrointestinali, favorisce il processo di

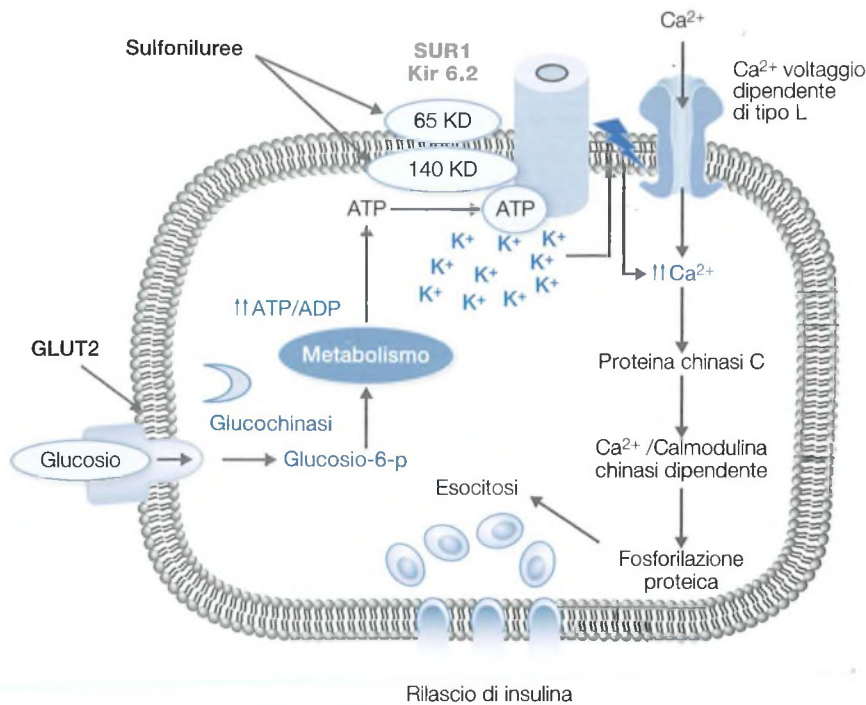


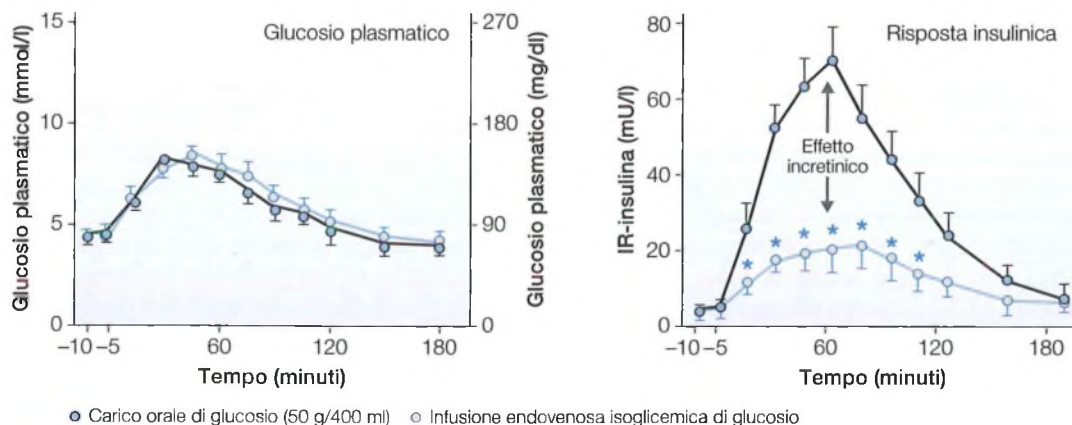
FIGURA 31.3 Regolazione della secrezione dell'insulina nelle β -cellule dell'isola pancreatica. Sono riportati la via metabolica che media la risposta al glucosio e il meccanismo d'azione delle sulfoniluree. Questa classe di farmaci stimola la liberazione di insulina legandosi a un recettore posto sulla membrana della β -cellula, denominato recettore per le sulfoniluree (SUR1/ABCC8) e che corrisponde a una subunità dei canali del potassio ATP-sensibili. Le sulfoniluree esercitano i loro effetti sulla β -cellula mimando l'aumento del rapporto ATP/ADP indotto fisiologicamente dagli stimoli metabolici. Anche le glinidi agiscono con un meccanismo analogo, ma si legano a un sito di SUR1 distinto da quello delle sulfoniluree.

esocitosi dell'insulina. Questo meccanismo può spiegare perché la risposta β -cellulare al glucosio sia più marcata quando lo zucchero viene somministrato per os che per via ev, fenomeno chiamato effetto incretinico.

Il concetto di incretina si basa sull'osservazione che dosi equivalenti di glucosio somministrate per via enterale determinano uno stimolo alla secrezione insulinica molto più potente rispetto a una somministrazione endovenosa (Figura 31.4). Questo sistema è stato chiamato "asse entero-insulare", per sottolineare il rapporto fra mucosa intestinale e attività endocrina del pancreas. Allo stato attuale solo 2 ormoni sono considerati incretine: il GIP, o polipeptide insulinotropico glucosio-dipendente, e il GLP-1, o peptide glucagone simile.

GIP, polipeptide insulinotropico glucosio-dipendente

Il GIP viene prodotto dalle cellule K del digiuno e del duodeno. Nella sequenza amminoacidica di questo ormone, in posizione 2 c'è un residuo di alanina che lo rende un substrato perfetto per la peptidasi Dipeptididipeptidasi IV (DPP-IV), enzima presente sulla membrana cellulare di molti organi. Di questo enzima è presente anche una forma circolante. L'emivita plasmatica del GIP è di circa 7 minuti. Il rene svolge un ruolo centrale nella clearance del GIP, come testimoniato dalle elevate concentrazioni circolanti che si osservano in presenza di insufficienza renale. In accordo con questo, l'orletto a spazzola delle cellule tubulari renali contiene un grande quantità



● Carico orale di glucosio (50 g/400 ml) ○ Infusione endovenosa isoglicemica di glucosio

FIGURA 31.4 Effetto incretinico. La risposta insulinica è maggiore dopo un carico orale che dopo un carico endovena di glucosio, a parità di concentrazioni plasmatiche dello zucchero.

dell'enzima DPP-IV. Lo stimolo secretorio del GIP è strettamente glucosio-dipendente e si realizza a livello della β -cellula. Diversamente dagli altri secretagoghi, il GIP non solo induce il rilascio di insulina ma stimola anche la proliferazione delle β -cellule, anche attraverso un'azione antiapoptotica. Il GIP sembrerebbe pertanto implicato nel mantenimento della massa β -cellulare, elemento centrale nella fisiopatologia del diabete tipo 2. Le azioni del GIP richiedono il legame a uno specifico recettore, di cui esistono due isoforme, una di 466 e l'altra di 493 amminoacidi.

GLP-1, peptide glucagone simile

Il GLP-1 è prodotto dalle cellule enteroendocrine L, localizzate nella porzione distale dell'intestino tenue e del colon, sotto l'azione dell'enzima PC1/3, una convertasi che scinde la molecola del proglucagone. Il peptide biologicamente attivo è il GLP-1 (1-37), che in circolo si ritrova in due isoforme equipotenti: il GLP-1 (7-37) e il GLP-1 (7-36). Il GLP-1 (7-36) è l'isoforma attiva maggiormente rappresentata nell'uomo. L'ingestione di un pasto misto è lo stimolo fisiologico per la secrezione di GLP-1. Il profilo secretorio è tipicamente bifasico, con un picco dopo circa 15 minuti dall'inizio del pasto e un aumento prolungato dopo 30-60 minuti. Anche stimoli endocrini e nervosi (il vago attraverso recettori muscarinici M1) modulano la secrezione di GLP-1. Il GLP-1 come il GIP presenta un residuo di alanina in posizione 2 che lo rende pure suscettibile all'azione dell'enzima DPP-IV. Il GLP-1 agisce sulle cellule bersaglio attraverso il legame a uno specifico recettore, denominato GLP-1R, una proteina di 463 amminoacidi associata a una G-proteina ed espressa prevalentemente sulle cellule β pancreatiche. Tramite l'attivazione di specifici enzimi, questo ormone determina un aumento dei livelli di calcio intracellulare che rappresentano lo stimolo alla secrezione di insulina. A questo effetto concorre anche il blocco diretto dei canali del potassio ATP-dipendenti, che sono responsabili delle oscillazioni del potenziale di membrana a riposo e intervengono nel regolare la depolarizzazione e la ripolarizzazione. Il GLP-1 stimola l'espressione del gene della proinsulina attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione Pdx-1, che è uno dei regolatori fondamentali del sistema che controlla la biosintesi e la secrezione di insulina. Il GLP-1 esercita anche un'azione trofica e antiapoptotica sulla β -cellula. Un ulteriore meccanismo ipoglicemizzante del GLP-1 è l'inibizione della secrezione di glucagone, con una prevalente azione sulla glicemia post-prandiale. I recettori per il GLP-1 sono stati trovati anche in strutture cerebrali: ipotalamo, talamo, amigdala, corteccia. A questo livello il GLP-1 può controllare e regolare i meccanismi della fame e della sazietà. L'iperglicemia protratta determina a breve termine un aumento progressivo della secrezione β -cellulare. Tuttavia, quando l'esposizione a concentrazioni elevate di glucosio si mantiene a lungo, si assiste a un fenomeno opposto definito glucotossicità, le cui basi molecolari non sono ancora ben definite ma che presumibilmente coinvolgono modificazioni nell'espressione di vari geni della β -cellula.

Il trasportatore del glucosio GLUT4 viene modulato dall'insulina e dall'esercizio fisico attraverso meccanismi diversi

Nei tessuti modulati dall'insulina è presente soprattutto l'isoforma GLUT4 del trasportatore del glucosio. L'insulina agisce su questo trasportatore sia stimolandone la traslocazione da vescicole di deposito intracellulari alla superficie della cellula che aumentandone l'attività intrinseca. Questi effetti permettono un rapido e cospicuo incremento del trasporto del glucosio nei tessuti insulinodipendenti, in particolare muscolo scheletrico e tessuto adiposo.

Lo stimolo insulinico attiva la fosfatidilinositolo3-chinasi (PI3-K), che, attraverso una serie di passaggi intermedi, porta alla liberazione del trasportatore dal legame con una proteina che lo tiene ancorato alle membrane intracellulari. A valle della PI3K, il segnale si biforca seguendo 2 assi: il primo asse fa capo a AKT→AS160→Rab, mentre il secondo segue il percorso Rac→actina→ α -actinina4 (Figura 31.5).

L'asse di AKT prevede la fosforilazione del substrato di 160 kDa di AS160 che inibisce l'attività delle proteine Rab-GTPasi. La conseguenza di questa inibizione è la stabilizzazione delle proteine target di Rab nella forma legata a GPT, che si suppone promuova il traffico ve-

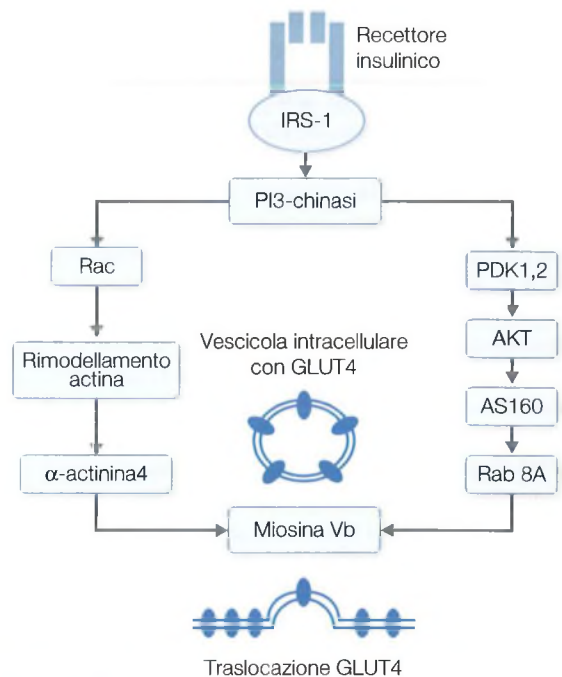


FIGURA 31.5 Effetti dell'insulina su GLUT4. L'insulina, attraverso vari meccanismi, induce la traslocazione dei GLUT4 dai depositi intracellulari alla membrana citoplasmatica, con parallelo aumento di attività di tali trasportatori. A valle della fosfatidilinositolo3-chinasi, il segnale insulinico si biforca, seguendo 2 assi: il primo fa capo a AKT→AS160→Rab, mentre il secondo segue il percorso Rac→actina→ α -actinina4. Le due vie convergono alla fine in un processo che libera GLUT4 dal legame con una proteina che lo ancora e determina la fusione delle vescicole intracellulari contenenti il trasportatore con la membrana plasmatica.

scicolare all'interno delle cellule. Il secondo asse ruota attorno alla proteina α -actinina4 che è in grado di legare sia il trasportatore GLUT4 che i filamenti di actina. L'attivazione di questa via dopo lo stimolo insulinico sembra promuovere la fusione delle vescicole contenenti GLUT4 con la membrana plasmatica. A livello biochimico la fusione delle vescicole GLUT4 con la membrana plasmatica delle cellule adipose o muscolari è mediata dalle proteine VAMP2 associate al recettore SNAP (SNARE), dalla sintaxina4 e da SNAP23 nonché dai loro partner regolatori MUNC18C, SYNIP e probabilmente 5-naptoglobina. Anche la contrazione muscolare, la depolarizzazione della membrana e il disaccoppiamento mitocondriale inducono l'endocitosi di GLUT4, ma attraverso meccanismi che non coinvolgono nessuno dei segnali indotti dall'insulina e apparentemente a partire da pool differenti di trasportatori intracellulari. Diverse evidenze suggeriscono un coinvolgimento dell'enzima proteinchinasi AMP-dipendente (AMPK) nell'incremento della captazione del glucosio indotto dalla contrazione muscolare. Le differenze di regolazione e compartimentalizzazione di GLUT4 rendono conto dell'effetto additivo che insulina e attività fisica hanno sul trasporto del glucosio nel muscolo. Questi concetti hanno una ricaduta pratica nell'interazione fra insulina o farmaci antidiabetici secretagoghi ed esercizio fisico.

Il recettore per l'insulina e il suo sistema di trasduzione

L'insulina esplica i suoi effetti modulando l'attività di un recettore specifico di membrana, strutturalmente molto simile al recettore per l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) e ad attività tirosinchinasica.

Esistono due isoforme del recettore insulinico, denominate A e B, che vengono prodotte dallo stesso gene per splicing alternativo (che determina assenza/presenza dell'esone 11). La isoforma A prevale nello sviluppo embrionale e nei tessuti tumorali, media prevalentemente effetti mitogeni e di crescita e mostra alta affinità sia per l'insulina che per l'IGF-II. L'isoforma B prevale invece nella vita post-natale, induce effetti più spiccatamente metabolici e ha affinità elevata per la sola insulina.

Malgrado la simile affinità per l'insulina e l'IGF-II, la isoforma A presenta risposte biologiche almeno in parte diverse quando stimolata dai due ormoni. La isoforma A induce una risposta metabolica all'insulina attenuata e una disregolazione di questo splicing recettoriale può essere causa di alterata sensibilità all'insulina e di diabete. Nella distrofia miotonica, patologia caratterizzata da severa insulinoreistenza, è stata osservata una aumentata espressione di una proteina (CUG-BP) in grado di modulare questo splicing.

Il significato fisiologico di questa modalità di regolazione del recettore insulinico è interpretabile comunque solo in parte. Nella β -cellula, ad esempio, l'insulina induce l'espressione del suo stesso gene attraverso l'isoforma A e della glucocinasi, elemento chiave nella risposta secretoria agli stimoli metabolici, attraverso l'isoforma B.

L'iperglicemia cronica induce una riduzione dell'espressione del recettore nella β -cellula e aumenta la quota relativa della isoforma B. Queste modificazioni si associano a una riduzione della secrezione insulinica. Al momento non vi sono strumenti farmacologici in grado di influenzare direttamente questi processi.

Il recettore per l'insulina è una tirosinchinasi capace di fosforilare vari substrati

Il legame con l'ormone determina dimerizzazione del recettore e la autofosforilazione di residui tirosinici sulla subunità- β , con attivazione della tirosinchinasi. I siti di autofosforilazione fungono da punto di attracco per proteine denominate IRSs (*Insulin Receptor Substrates*), in quanto esse rappresentano substrati per la tirosinchinasi. Finora sono stati identificati almeno 6 diversi IRS (IRS-1/IRS-6), tre dei quali presenti nell'uomo e uno (IRS-3) documentato finora solo nel tessuto adiposo dei roditori. La fosforilazione degli IRS è indispensabile per l'attivazione di reazioni a cascata, che mediano le differenti risposte biologiche all'ormone. Gli IRSs non hanno attività catalitica propria ma possiedono multipli siti di legame per varie molecole, localizzati intorno a residui tirosinici attivati dal processo di fosforilazione, e fungono così da elementi critici per l'accoppiamento spaziale fra il recettore insulinico e le molecole coinvolte direttamente nella trasmissione del segnale (docking proteins). Il legame agli IRSs di queste molecole avviene in genere in corrispondenza di domini SH2 (*Src-Homology-2*).

Al contrario, la fosforilazione in serina degli IRSs inibisce la trasmissione del segnale insulinico. Alterazioni metaboliche, come l'eccesso cronico di glucosio o di FFA, e citochine di origine adipocitaria, come il TNF- α , determinano questo risultato. La fosforilazione in serina sembra comunque un meccanismo di inibizione a breve termine dell'azione IRS-mediata dell'insulina. L'inibizione a lungo termine appare sostenuta invece da fenomeni di degradazione di queste molecole a livello dei proteasomi. Fra i fattori che aumentano questa degradazione vi è la stessa iperinsulinemia cronica che consegue, come meccanismo compensatorio, all'insulinoreistenza. In accordo con questo, il sistema ubiquitina/proteasomi mostra una aumentata attività nel diabete tipo 2 mentre, ancora in modelli animali, la sua inibizione farmacologica migliora la sensibilità insulinica.

Insulina e IGFs hanno effetti in parte simili e condividono varie vie di trasmissione del segnale. Gli IRSs, malgrado siano utilizzati da ormoni diversi nella trasmissione del loro segnale, giocano un ruolo importante nel conferire specificità agli stimoli e nell'integrarne le risposte. IRS-1 e IRS-2 sembrano ricoprire, in particolare, un ruolo chiave nel controllo del metabolismo glucidico. Modelli animali transgenici con difetto selettivo di IRS-2 sviluppano diabete e manifestano alterazioni della sensibilità epatica e periferica all'insulina e della secrezione β -cellulare che sono simili a quelle che caratterizzano il diabete tipo 2 dell'uomo.

Un ruolo centrale in molti effetti metabolici dell'insulina è svolto dalla attivazione della PI3K, che è ligando

comune di IRS-1 e IRS-2. I prodotti di PI3K attivano alcune cascate serinchinasiche come la via di Akt e delle isoforme anomale di PKC e queste vie stimolano consensualmente il trasporto del glucosio. Il calo ponderale migliora i difetti di queste vie riportati nel soggetto obeso, suggerendo che tali alterazioni sono in gran parte acquisite. Va ricordato che Akt controlla anche l'attività della glicogenosintasi, enzima chiave del metabolismo non ossidativo del glucosio, e la sintesi di vari enzimi coinvolti nel metabolismo energetico, attraverso l'interazione con fattori di trascrizione, come FKHRL1 (appartenente alla famiglia dei forkhead transcription factors), che regolano la sintesi di enzimi gluconeogenetici.

La riduzione della capacità secretoria β -cellulare che accompagna e determina il passaggio dall'insulinore-sistenza "compensata" al diabete tipo 2 non dipende verosimilmente, come ipotizzato in passato, da un esaurimento da superlavoro della β -cellula, ma da una alterazione della regolazione dei fenomeni di proliferazione/apoptosi a opera di vari fattori, genetici e acquisiti, fra cui, ancora una volta, alterazioni metaboliche come la stessa iperinsulinemia, l'iperglicemia e l'iperlipidemia. I diversi effetti dell'insulina mostrano una differente sensibilità alla regolazione ormonale: ad esempio, la concentrazione di insulina a cui si osserva una inibizione semimassimale della lipolisi o della chetogenesi è sensibilmente minore di quella richiesta per una stimolazione semimassimale dell'utilizzazione del glucosio. Questo spiega perché nel diabete tipo 2, in cui il difetto di insulina è solo relativo, vi possa essere una iperglicemia molto marcata senza chetoacidosi. Vi sono anche differenze nelle risposte all'ormone che dipendono dal tessuto esaminato. A questo proposito, mentre IRS-1 media gli effetti dell'insulina soprattutto a livello muscolare e adiposo, IRS-2 svolge un ruolo rilevante anche a livello epatico e β -cellulare.

Farmacologia del controllo glicemico

La terapia del diabete tipo 2 si avvale di numerosi farmaci, che agiscono su diversi aspetti della fisiopatologia di questa malattia (Tabella 31.2). In questo paragrafo, dedicato al meccanismo d'azione dei farmaci utilizzati nel controllo della glicemia, non viene trattato l'utilizzo dell'insulina i cui aspetti meccanicistici sono stati trattati nei paragrafi precedenti.

Modulazione farmacologica della funzionalità delle cellule β

Alcuni farmaci stimolano la secrezione insulinica modulando l'attività dei canali del potassio ATP-dipendenti

Tra i farmaci stimolanti il rilascio di insulina vanno ricordate anzitutto le sulfoniluree, che rappresentano da oltre quarant'anni un presidio nella terapia del diabete tipo 2. Esistono varie molecole appartenenti a questa classe ma le differenze riguardano soprattutto la farmacocinetica. Recentemente, sono state introdotte altre sostanze che stimolano la secrezione insulinica, la repaglinide, derivato della meglitinide, e la nateglinide, derivato della fenilalanina, entrambe chimicamente distinte dalle sulfoniluree, sebbene abbiano un meccanismo d'azione sovrapponibile. Tutti i farmaci con azione secretogoga β -cellulare oggi disponibili agiscono comunque legandosi al medesimo recettore posto sulla membrana della β -cellula, denominato recettore per le sulfoniluree (SUR1/ABCC8) (Figura 31.3). Questa struttura corrisponde a una subunità dei canali del potassio ATP-sensibili, che lega ATP e ADP. Sulfoniluree e "glinidi" esercitano i loro effetti sulla β -cellula mimando l'aumento del rapporto ATP/ADP indotto dagli stimoli metabolici. I siti di legame a SUR1 di sulfoniluree e glinidi sono comunque distinti e vi sono differenze nelle modalità di interazione con il recettore di questi farmaci. La nateglinide ha un legame molto fugace con SUR1.

Le sulfoniluree esplicano anche altri effetti, documentati in vitro ma di importanza non ben definita in vivo, fra cui un potenziamento del trasporto del glucosio GLUT4-dipendente a livello muscolare, che appare mediato da un aumento di attività della PI3K-IRS-1 dipendente.

Mutazioni con perdita di funzione di SUR1 e di KIR6.2, altra subunità di questi canali del potassio, possono provocare una ipersecrezione di insulina, che si manifesta con sindromi ipoglicemiche familiari. Al contrario, mutazioni con guadagno di funzione di queste subunità provocano diabete neonatale.

Le sulfoniluree possono legarsi al recettore SUR2 a livello cardiaco e questa interazione può potenzialmente indurre effetti indesiderati, come aritmie e ridotta capacità di adattamento all'ischemia. L'entità di questo legame varia con il tipo di molecola e con le concentrazioni circolanti del farmaco. La nateglinide ha una scarsa affinità per SUR2. Da molti anni è noto che la secrezione insulinica può essere inibita dal diazossido e questo farmaco viene per

TABELLA 31.2 Classi di farmaci ipoglicemizzanti orali in commercio e loro principali azioni

Farmaci	↑ Produzione di insulina	↑ Sensibilità all'insulina	↑ Produzione epatica di glucosio	Ritardato assorbimento CHO
Biguanidi		+	+++	
Sulfoniluree/meglitinidi	+++			
Incretine	+++		+	
Tiazolidinedioni		+++	+	
inibitore α -glucosidasi				+++

questo impiegato nella terapia delle sindromi ipoglicemiche sostenute da ipersecrezione β -cellulare. Questa sostanza agisce sui recettori SUR1, in questo caso attivando i canali del potassio ATP-dipendenti e portando a iperpolarizzazione della β -cellula, con conseguente inibizione della secrezione insulinica.

Sistema delle incretine

Il sistema delle incretine ha dato luogo a nuove classi di farmaci che stimolano la secrezione insulinica

Come prima ricordato, l'introduzione di cibo determina il rilascio di numerosi ormoni gastrointestinali che regolano molteplici funzioni, tra cui la secrezione di ormoni pancreatici. In considerazione di questo fatto, la possibilità che sostanze prodotte dalla mucosa duodenale potessero essere usate nella cura del diabete era stata postulata già diversi anni fa sulla base dell'attività biologica di questi ormoni (Tabella 31.3).

In considerazione delle caratteristiche biologiche di queste sostanze, prima ricordate, sono state sviluppate due strategie di approccio farmacologico al sistema delle incretine:

1. con analoghi naturali o sintetici del GLP-1, caratterizzati da un'emivita più lunga rispetto all'ormone naturale e somministrati per via sottocutanea;
2. con inibitori dell'enzima DPP-IV, somministrabile per os, allo scopo di aumentare l'emivita delle incretine endogene riducendone la degradazione. Tra gli aspetti più interessanti di questo approccio al trattamento del diabete tipo 2 vanno ricordati il carattere glucosio-dipendente dello stimolo sulla secrezione insulinica, che elimina il rischio di ipoglicemie, l'inibizione della secrezione di glucagone, il potenziale effetto antiapoptotico sulle β -cellule e la riduzione del peso, quest'ultimo limitatamente all'uso degli agonisti del GLP-1 (Tabella 31.4).

Modulazione del signalling insulinico

Gli effetti dei farmaci che agiscono sul signalling insulinico sono in parte mediati dalla attivazione della AMPK

Numerose sostanze modulano il signalling del recettore insulinico, potenziandolo o inibendolo. L'effetto agonista è di particolare interesse terapeutico data la rilevanza che può avere nella correzione dell'insulinoresistenza. Nonostante questo, le conoscenze sui meccanismi d'azione dei farmaci che agiscono su questa via sono ancora molto limitate. A questo proposito, da tempo è noto che i farmaci della classe delle biguanidi, fenformina (oggi praticamente abbandonata per il rischio di acidosi lattica) e metformina, sono in grado di potenziare l'azione dell'insulina e che questo effetto si associa a una riduzione adattativa dei livelli di insulina. Per questa proprietà "insulinosensibilizzante" tali farmaci sono impiegati da molti anni in Europa nella terapia del diabete tipo 2 e recentemente il loro utilizzo è stato approvato e ha avuto rapidamente larga diffusione anche negli Stati Uniti. Le evidenze di effetti favorevoli della metformina su molti fattori di rischio cardiovascolare e sulla mortalità generale e cardiovascolare nei soggetti con diabete hanno portato negli ultimi anni a considerare questo vecchio farmaco il primo strumento da utilizzare nella terapia farmacologica del diabete tipo 2.

Il meccanismo molecolare d'azione delle biguanidi è rimasto a lungo sconosciuto. Solo recentemente è stato documentato che queste sostanze stimolano la AMPK e si ipotizza che questo effetto rappresenti il principale meccanismo che ne media l'azione metabolica.

La AMPK rappresenta l'elemento finale di una cascata di proteinchinasi che viene attivata ogniqualvolta vi sia un aumento del rapporto AMP/ATP. Questo aumento segnala un depauperamento dello stato energetico cellulare e può essere la conseguenza sia di una ridotta produzione di ATP, come nell'ipossia o nella carenza di disponibilità cellulare di glucosio, che di un aumentato consumo di ATP, come nell'esercizio fisico. Si ritiene che l'attivazione della AMPK aumenti l'ossidazione degli acidi grassi e la produzione di energia e inibisca i processi anabolici che non sono indispensabili per la immediata sopravvivenza cellulare, con riduzione dell'esterificazione degli stessi acidi grassi a trigliceridi e diminuzione del contenuto adiposo intracellulare. La AMPK attiva anche il trasporto del glucosio, con meccanismi che appaiono non insulino-dipendenti ma che si traducono comunque in

TABELLA 31.3 Azioni del GIP e GLP-1 e potenziale ruolo farmacologico nella terapia del diabete tipo 2 (DT2)

GIP		Alterazioni nel DT2		GLP-1
Inefficace nel DT2	→	Secrezione insulinica	←	Secrezione insulinica ↑
Secrezione glucagone ↑	→	Iperglucagonemia	←	Secrezione glucagone ↓
β -cellule apoptosi ↓ β -cellule replicazione ↑	→	β -cellule apoptosi ↑ β -cellule massa ↓	←	β -cellule apoptosi ↓ β -cellule replicazione ↑
Deposizione grasso ↑	→	Obesità	←	Assunzione di cibo ↓ Peso corporeo ↓
Nessun effetto	→	Svuotamento gastrico ↑, = o ↓	←	Svuotamento gastrico ↓
Nessun effetto	→	Iperlipidemia	←	Trigliceridi post-prandiali ↓ Acidi grassi liberi post-prandiali ↓
Nessun effetto	→	Insulinoresistenza	←	Nessun effetto immediato (sensibilità insulinica ↑)

→ Potenzialmente efficace; → Nessun effetto; → Potenzialmente dannoso

TABELLA 31.4 Sistema delle incretine. Differenze nell'azione farmacologica degli agonisti del GLP-1 e degli inibitori del DPP-IV

Azione	Agonista GLP-1	Inibitore DPP-IV
Via di somministrazione	Sottocute	Orale
Secrezione di insulina	Aumentata ↑↑	Aumentata ↑
Secrezione di glucagone	Soppressa ↓↓	Soppressa ↓
Iperglicemia post-prandiale	Ridotta ↓↓	Ridotta ↓
Svuotamento gastrico	Molto rallentato	Nessun effetto
Appetito	Soppresso	Nessun effetto
Senso di sazietà	Indotto	Nessun effetto
Peso corporeo	Ridotto	Neutrale
Funzione β-cellula	Preservata, rapporto proinsulina/insulina migliorato	Preservata, rapporto proinsulina/insulina migliorato
Effetti avversi gastrointestinali	Frequenti	Rari

effetti insulino-simili. Queste osservazioni suggeriscono che la AMPK svolga un ruolo primario nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico in funzione dello stato energetico cellulare. L'effetto insulinosensibilizzante che consegue alla sua attivazione potrebbe quindi essere almeno in parte indiretto.

L'effetto della metformina sulla AMPK sembra indipendente da variazioni del rapporto AMP/ATP e conseguenza di una fosforilazione attivante a livello della treonina-172, sito regolatorio chiave nella subunità catalitica dell'enzima. La metformina ha comunque verosimilmente anche altri effetti, ad esempio sulla catena respiratoria mitocondriale (complesso I mitocondriale). Dal punto di vista biologico, l'effetto antidiabetico della metformina appare legato in primo luogo a una inibizione della gluconeogenesi epatica, ma vi sono anche evidenze di un incremento nel trasporto del glucosio a livello muscolare. Il sistema della AMPK può essere stimolato anche da un'altra categoria di farmaci insulinosensibilizzanti, quella dei tiazolidinedioni, agonisti del recettore per il PPAR- γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ*), recettore nucleare i cui ligandi naturali sembrano costituiti da acidi grassi e altri substrati di derivazione lipidica. La stimolazione di questo recettore attiva la trascrizione di geni che regolano la differenziazione degli adipociti e l'adipogenesi e modulano direttamente e indirettamente il metabolismo glucidico e lipidico, regolando anche la secrezione β -cellulare. L'effetto dei tiazolidinedioni sulla AMPK riconosce meccanismi molecolari ancora non precisati ma certamente diversi da quelli della metformina e che comportano marcate modificazioni del rapporto AMP/ATP. Gli effetti dei tiazolidinedioni sulla sensibilità insulinica vengono attribuiti soprattutto a meccanismi indiretti e in particolare alla riduzione dei livelli circolanti di FFA, con le conseguenze che questo fenomeno ha a livello epatico e muscolare, e alla modulazione della produzione di adiponectina e altre citochine da parte del tessuto adiposo. A questo proposito va ricordato che i tiazolidinedioni inducono una redistribuzione del grasso dalle sedi omentali e dai principali organi coinvolti nel metabolismo glucidico, fegato e muscolo, verso gli adipociti periferici. Questo può spiegare gli effetti metabolici favorevoli nonostante

la tendenza all'aumento del grasso corporeo che questi farmaci inducono. Nell'utilizzo clinico di questi farmaci va tenuto in considerazione l'effetto di ritenzione idrica, per un effetto diretto sul tubulo renale, che aumenta il rischio di scompenso cardiaco. Inoltre, recenti evidenze mostrano un aumento del rischio di fratture ossee.

Modulazione dell'assorbimento intestinale del glucosio

La modulazione farmacologica dell'assorbimento intestinale del glucosio è utile a controllare le escursioni glicemiche post-prandiali

L'acarbosio ha un meccanismo d'azione unico. Si lega con elevata affinità e specificità alle α -glucosidasi, presenti sul bordo a spazzola delle cellule del piccolo intestino. Questi enzimi sono responsabili dell'idrolisi dei disaccaridi e dei carboidrati più complessi a glucosio e altri monosaccaridi nella parte superiore del piccolo intestino. Come inibitore competitivo delle α -glucosidasi, l'acarbosio ritarda la digestione dei carboidrati e riduce direttamente la glicemia post-prandiale. L'acarbosio è risultato un farmaco efficace e sicuro per ritardare lo sviluppo del diabete e per controllare l'iperglicemia nel diabete manifesto, con un particolare effetto sulla glicemia post-prandiale.

Insulinoresistenza e infiammazione cronica: un nuovo possibile target terapeutico

Evidenze preliminari di un'azione farmacologica antidiabetica dei salicilati

Vi sono varie evidenze di un nesso patogenetico fra flogosi cronica di basso grado e insulinoresistenza e questa interazione potrebbe realizzarsi, almeno in parte, attraverso l'azione di citochine ad azione serinichinasi. A questo proposito va segnalato che, in modelli animali di insulinoresistenza, i salicilati attenuano l'iperinsulinemia e le alterazioni metaboliche a questa associate, con parallela riduzione della fosforilazione in serina e aumento di quella in tirosina degli IRSs. Questa azione

ha delle potenziali applicazioni nella terapia del diabete tipo 2.

La prima segnalazione a favore di un potenziale impiego di antinfiammatori nella cura del diabete risale a circa un secolo fa, quando fu segnalato che l'uso di alte dosi di salicilato di sodio in pazienti affetti da diabete tipo 2 riduceva la glicosuria. Questa vecchia osservazione ha trovato nuove conferme in uno studio pubblicato di recente, il TINSAL-T2D (Targeting inflammation using salsalate in type 2 diabetes) che fornisce un'evidenza chiara a favore della efficacia dell'uso di antinfiammatori non steroidei (NSAIDs) nel trattamento dell'iperglicemia del diabete tipo 2. Il salsalato è un profarmaco del salicilato, a lungo usato nel trattamento del dolore reumatico e che ha dimostrato un buon profilo di sicurezza. I salicilati non acetilati, come il salsalato, non inibiscono le piastrine e sono insolubili nell'ambiente acido gastrico. Tali proprietà riducono il rischio di emorragie e/o effetti gastrici avversi. L'uso del salsalato in questo studio

randomizzato controllato ha prodotto una riduzione dei livelli di emoglobina glicata superiore allo 0,5%, paragonabile al risultato ottenibile con alcuni farmaci approvati nella terapia del diabete tipo 2, documentando anche un buon profilo di sicurezza. Anche altri fattori di rischio cardiovascolare hanno mostrato variazioni favorevoli con l'uso del salsalato: i trigliceridi si sono ridotti, mentre la adiponectina, un'adipochina con attività antidiabetica e antiaterogena, è aumentata. Il salsalato, diversamente da altri NSAIDs, inibisce il fattore nucleare KB (NFκB) e non le ciclo ossigenasi. Questo fattore nucleare svolge un ruolo chiave nella trascrizione di numerose molecole implicate nell'infiammazione: TNF- α , IL-6, IL-1 β , resistina e C-C motivo chemochina 2 e promuove il reclutamento dei macrofagi nel tessuto adiposo. Sebbene sia ancora aperto il dibattito se l'infiammazione sia causa o conseguenza dell'insulinoreistenza, lo studio TINSAL-TD2 suggerisce che trattare l'infiammazione può rappresentare una strategia aggiuntiva nella cura delle malattie metaboliche.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Il glucosio è un substrato essenziale per la vita e la glicemia è soggetta a un complesso sistema di regolazione omeostatica, cui partecipano numerosi ormoni.
- ▶ Le cellule accedono al glucosio attraverso specifici trasportatori di membrana.
- ▶ La secrezione di insulina è regolata dalla glicemia.
- ▶ La metformina è il farmaco di prima linea nella cura del diabete tipo 2.
- ▶ I farmaci attivi sul sistema incretinerico stimolano la secrezione insulinica e rappresentano un nuovo ed efficace strumento nella cura del diabete tipo 2.

Bibliografia essenziale

- ▶ Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ. Docking proteins. *FEBS J* 2010;277:4356-69.
- ▶ Cheng Z, Tseng Y, White MF. Insulin signalling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:589-98.
- ▶ Doyle ME, Egan JM. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev* 2003;55:105-31.
- ▶ Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA et al.; TINSAL-T2D (Targeting Inflammation Using Salsalate in Type 2 Diabetes) Study Team. The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2010;152:346-57.
- ▶ Hanefeld M, Schaper F, Koehler C. Effect of acarbose on vascular disease in patients with abnormal glucose tolerance. *Cardiovasc Drugs Ther* 2008;22:225-31.
- ▶ Henry RR. Insulin resistance: from predisposing factor to therapeutic target in type 2 diabetes. *Clin Ther* 2003;25 Suppl B:B47-63.
- ▶ Klip A. The many ways to regulate glucose transporter 4. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009;34:481-7.
- ▶ Kulasa KM, Henry RR. Pharmacotherapy of hyperglycemia. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:2415-32.
- ▶ McClenaghan NH. Physiological regulation of the pancreatic{beta}-cell: functional insights for understanding and therapy of diabetes. *Exp Physiol* 2007;92:481-96.
- ▶ Mudaliar S, Henry RR. Incretin therapies: effects beyond glycemic control. *Eur J Intern Med* 2009;20 Suppl 2:S319-28.
- ▶ Sun Y, Bilan PJ, Liu Z, Klip A. Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:1909-14.
- ▶ Piya MK, Tahrani AA, Barnett AH. Emerging treatment options for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol* 2010;70:631-44.
- ▶ Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E141-5.
- ▶ Yaney GC, Corkey BE. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 2003;46:1297-312.

La comunicazione intercellulare

CAPITOLO 32

Il controllo farmacologico della funzione sinaptica

Michela Matteoli, Elisabetta Menna, Claudia Verderio

CAPITOLO 33

La trasmissione catecolaminergica

Sandra Sigala, Maurizio Memo, M. Cristina Missale, Pier Franco Spano

CAPITOLO 34

La trasmissione colinergica

Giancarlo Pepeu

CAPITOLO 35

La trasmissione serotoninergica

Maurizio Popoli, Laura Musazzi, Giorgio Racagni

CAPITOLO 36

La trasmissione istaminergica

Emanuela Masini

CAPITOLO 37

La trasmissione GABAergica

Mariangela Serra, Enrico Sanna, Giovanni Biggio

CAPITOLO 38

La neurotrasmissione mediata da aminoacidi eccitatori

Flavio Moroni

CAPITOLO 39

La trasmissione purinergica

Stefania Ceruti, Flaminio Cattabeni, Maria Pia Abbracchio

CAPITOLO 40

I neuropeptidi

Lucia Negri, Roberta Lattanzi

CAPITOLO 41

Il sistema oppioide

Patrizia Romualdi, Sanzio Candeletti

CAPITOLO 42

Il sistema endocannabinoide

Daniela Parolaro, Tiziana Rubino

CAPITOLO 43

Farmacologia dell'ossido nitrico

Emilio Clementi, Giacinto Bagetta, Giuseppe Nisticò

CAPITOLO 44

La cascata dell'acido arachidonico

Carlo Patrono, Paola Patrignani

10

Il controllo farmacologico della funzione sinaptica

CAPITOLO

32

Michela Matteoli, Elisabetta Menna, Claudia Verderio

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le basi teoriche e pratiche per comprendere i meccanismi molecolari della formazione e della funzione della sinapsi
- ▶ Acquisire le nozioni di base sul funzionamento dei farmaci e delle tossine che agiscono alla sinapsi
- ▶ Acquisire i concetti alla base dell'eziologia di patologie neurologiche e psichiatriche causate da un'alterazione della funzionalità sinaptica (sinaptopatie)

La sinapsi

Caratteristiche generali

La caratteristica fondamentale dei neuroni è rappresentata dalla capacità di comunicare gli uni con gli altri in maniera rapida, a grande distanza e con una eccezionale precisione. I siti di comunicazione tra neuroni sono le sinapsi, termine coniato da Sherrington nel 1897. La trasmissione delle informazioni a livello delle sinapsi, denominata trasmissione sinaptica, controlla tutte le funzioni dell'organismo, inclusi gli aspetti della conoscenza, quali l'attenzione, la percezione, l'apprendimento, il processo decisionale, così come l'umore e l'affetto. Si stima che nel cervello umano siano presenti più di 10^{14} sinapsi. Dal punto di vista strutturale le sinapsi sono dei siti di contatto cellula-cellula (contatti sinaptici, giunzioni sinaptiche) che consentono a una cellula nervosa di trasmettere un segnale di natura elettrica o chimica a un'altra cellula bersaglio (nervosa o di altro tipo). A parte poche eccezioni, le sinapsi si formano tra la terminazione di un assonne presinaptico e una cellula postsinaptica.

In natura esistono principalmente due tipologie di giunzioni sinaptiche: le sinapsi elettriche e le sinapsi chimiche. Le prime, ponendo in diretto contatto il citoplasma delle cellule coinvolte, permettono uno scambio di segnali elettrici senza alcun intermediario di natura chimica. Esse sono molto frequenti negli invertebrati e sono sempre meno rappresentate negli organismi più complessi. Nelle sinapsi elettriche, le membrane delle cellule presinaptica e postsinaptica sono separate da uno spazio di 3-4 nm, attraversato da canali proteici, detti giunzioni comunicanti (*gap junctions*), che creano

continuità tra il citoplasma delle due cellule. Le *gap junctions* sono formate da due emicanali giustapposti, detti connessioni, formati da subunità, dette connesine, che rendono possibile il passaggio bidirezionale di ioni, di metaboliti e di messaggeri intracellulari, determinando quindi una "continuità" elettrica e metabolica tra la cellula presinaptica e quella postsinaptica.

La maggior parte dei contatti sinaptici nel sistema nervoso centrale (SNC) è, tuttavia, rappresentato da sinapsi di natura chimica. A livello funzionale, queste giunzioni si possono definire come siti specializzati nella trasmissione di informazioni in assenza di contatto diretto tra il neurone presinaptico, che trasmette il segnale (messaggero chimico) e la cellula postsinaptica, neuronale o meno. La trasmissione avviene in modo unidirezionale, dalla presinapsi alla postsinapsi, ed è quantale, formata, cioè, da segnali di una intensità predefinita. A livello morfologico, le sinapsi chimiche sono strutture dell'ordine dei micron caratterizzate da una forte asimmetria. Si distinguono, infatti, una terminazione presinaptica caratterizzata dalla presenza di vescicole contenenti il neurotrasmettitore (vescicole sinaptiche, SVs) e da una regione elettrodensa, detta zona attiva (AZ); e una terminazione postsinaptica specializzata per la ricezione e la risposta al neurotrasmettitore. Le due componenti della giunzione sinaptica sono separate da uno spazio di circa 20-25 nm, detto fessura sinaptica, nel quale vengono rilasciate e diffondono le molecole di neurotrasmettitore. Il bottone presinaptico e la regione postsinaptica sono mantenuti in registro e in stretta opposizione l'uno rispetto all'altra grazie a molecole di adesione di diversa natura, note come molecole di adesione transinaptiche, e da proteine della matrice extracellulare (Figura 32.1).

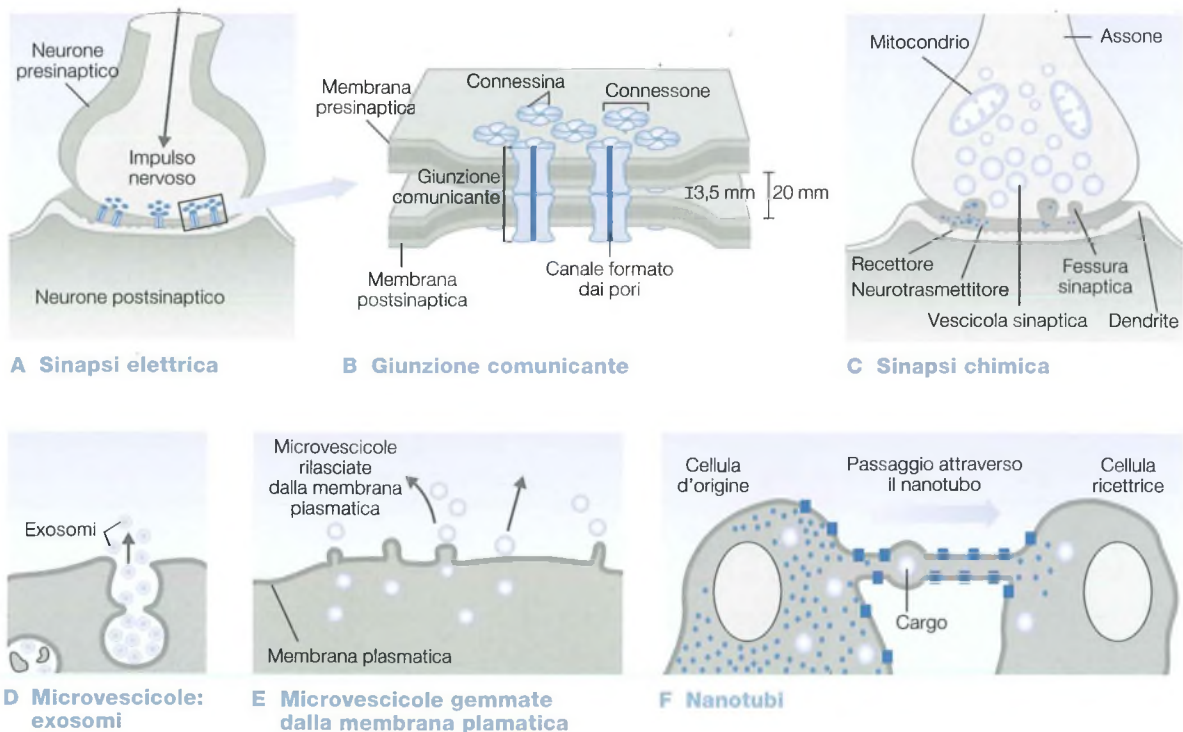


FIGURA 32.1 Rappresentazione schematica dei meccanismi di comunicazione intercellulare. **A, B.** Sinapsi elettrica e giunzione comunicante. Le cellule coinvolte sono in diretto contatto e ciò permette uno scambio di segnali elettrici senza alcun intermediario di natura chimica. Le membrane delle cellule presinaptica e postsinaptica sono separate da uno spazio di 3-4 nm, attraversato da canali proteici, detti connessioni. Queste giunzioni, denominate giunzioni comunicanti (*gap junctions*), creano continuità tra il citoplasma delle due cellule. I connessioni sono costituiti da due emicanali giustapposti, formati da subunità dette connesine, che rendono possibile il passaggio bidirezionale di ioni, metaboliti e messaggeri intracellulari. **C.** Sinapsi chimica. Queste giunzioni sono siti specializzati nella trasmissione di informazioni in assenza di contatto diretto tra il neurone presinaptico, che trasmette il segnale (messaggero chimico) e la cellula postsinaptica, neuronale o meno. **D, E.** Le microvescicole rilasciate negli spazi extracellulari, comprendenti sia microvescicole gemmate dalla membrana plasmatica (*shedding vesicles*, E) che derivanti da compartimenti intracellulari (*exosomes*, D), mediano il trasferimento di proteine, lipidi e materiale genetico da una cellula donatrice a una cellula bersaglio. Sono particolarmente importanti nei meccanismi di comunicazione tra neuroni e glia. **F.** I nanotubi sono ponti di citoplasma che consentono un passaggio diretto di componenti citosolici e perfino di organelli tra cellule non in diretto contatto.

Nonostante il rilascio di neurotrasmettitore nello spazio sinaptico rappresenti il meccanismo principale utilizzato dai neuroni per la segnalazione all'interno del sistema nervoso, va sottolineato che i neuroni comunicano tra di loro e con altri tipi cellulari anche attraverso meccanismi alternativi, che sono noti operare tra cellule al di fuori del sistema nervoso; tra questi meccanismi di comunicazione è importante ricordare la formazione di nanotubi e il rilascio di microvescicole extracellulari. I nanotubi sono ponti di citoplasma che consentono un passaggio diretto di componenti citosolici e perfino di organelli tra cellule non in diretto contatto. In modo analogo, le microvescicole rilasciate negli spazi extracellulari, comprendenti sia microvescicole gemmate dalla membrana plasmatica che derivanti da compartimenti intracellulari, mediano il trasferimento di proteine, lipidi e materiale genetico da una cellula donatrice a una cellula bersaglio. Grazie alle loro piccole dimensioni (da 50 nm a 1 μm), le microvescicole possono muoversi dal sito di rilascio per diffusione e si ritiene che possano rappresentare importanti vettori di agenti patogeni e infiammatori (Figura 32.1).

La sinapsi tripartita

Per il corretto sviluppo e funzionamento della sinapsi oltre alla componente neuronale, terminazione pre- e postsinaptica, è fondamentale il ruolo della glia, in particolare degli astrociti. Gli astrociti rappresentano il tipo più abbondante di cellule gliali del cervello e il loro numero eccede quello dei neuroni nel tessuto nervoso sia di roditori che di mammiferi (vedi CD: Approfondimento 32.1. *Ruolo degli astrociti nella trasmissione sinaptica*). La ricostruzione tridimensionale di astrociti ha evidenziato che ogni astrocita estende numerosi processi e occupa nel cervello uno spazio definito, non sovrapposto all'area controllata da astrociti adiacenti. Un singolo astrocita entra in contatto con centinaia di neuriti e più corpi cellulari di neuroni, e i suoi prolungamenti interagiscono con decine di migliaia di sinapsi. La stretta associazione morfologica tra neuroni e astrociti a livello sinaptico ha portato a coniare il nome di "sinapsi tripartita", costituita dall'astrocita avvolgente la sinapsi, oltre che dal terminale presinaptico e la specializzazione postsinaptica, ricono-

scendo il ruolo attivo dell'astrocita nella trasmissione sinaptica. L'influenza degli astrociti sulla trasmissione nervosa si può esplicitare a livello della singola sinapsi, sebbene queste cellule siano anche capaci di attivare una risposta omeostatica compensatoria. La risposta astrocitaria compensatoria, meglio nota come plasticità omeostatica, è essenzialmente mediata dal rilascio da parte degli astrociti di una citochina pro-infiammatoria, il TNF- α , in grado di influenzare la forza della connessione sinaptica. Gli astrociti sono inoltre in grado di captare variazioni globali nell'attività dei circuiti nervosi, come ad esempio l'attività ritmica cerebrale integrata, come quella legata alla genesi del ritmo del sonno (Figura 32.2).

La complessità dell'organizzazione sinaptica e le sinaptopatie

Se si considera che un neurone riceve e forma una media di 1000 connessioni sinaptiche e che nel cervello umano vi sono circa 10^{11} neuroni, si può calcolare che nel sistema nervoso vi siano circa 10^{14} sinapsi. Questa moltitudine di connessioni mostra caratteristiche funzionali distinte, che dipendono non solo dal neurotrasmettitore utilizzato, ma anche dalla elevata variabilità dei com-

ponenti molecolari che caratterizzano sinapsi che pur utilizzano lo stesso tipo di neurotrasmettitore. Questo supporta l'ormai condiviso concetto che la classificazione delle sinapsi secondo il tipo di trasmettitore non rifletta adeguatamente l'ampia diversità di sinapsi presenti nel sistema nervoso. È inoltre da considerare che le sinapsi non sono strutture stabili, ma mantengono una notevole plasticità strutturale e funzionale che permane per tutta la vita dell'individuo (vedi paragrafo: Formazione, mantenimento e plasticità della sinapsi).

Un ulteriore livello di complessità, che si aggiunge alla eterogeneità molecolare, cellulare e funzionale, è dato dal fatto che le sinapsi operano come "insiemi" all'interno di reti neurali, che sono a loro volta deputate a dirigere il livello di attività che permette il controllo delle funzioni dell'organismo, tra cui i processi cognitivi, quali l'attenzione, la percezione, l'apprendimento, i processi decisionali e l'umore.

Non stupisce che alterazioni a livello delle sinapsi possano essere causa di stati patologici. In effetti, mutazioni a carico di geni che codificano proteine sinaptiche sono presenti in varie malattie neurologiche e psichiatriche o in malattie neurodegenerative. Il termine "sinaptopatie" definisce i difetti a carico della struttura o della funzione

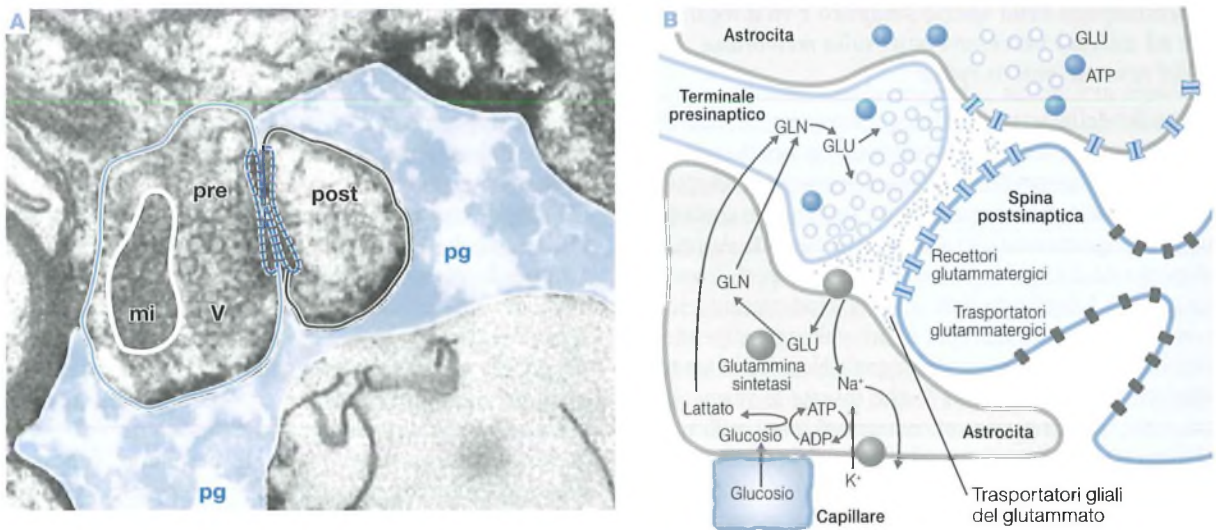


FIGURA 32.2 Interazioni tra la sinapsi e le cellule gliali: la sinapsi tripartita. **A.** Immagine di una sinapsi corticale ottenuta al microscopio elettronico. Si noti il compartimento presinaptico (linea azzurra) e il compartimento postsinaptico (linea nera). Sono evidenziati i processi delle cellule gliali (in azzurro) marcati per la presenza dell'enzima glutammina sintetasi, la densità pre e postsinaptiche, linea tratteggiata, le vescicole sinaptiche (V), un mitocondrio: mi: mitocondrio; pre: terminazione presinaptica; post: terminazione postsinaptica; pg: prolungamenti gliali. (Da: Xu-Friedman MA et al., 2001. Copyright permission 2006 from the Society of Neuroscience). **B.** Rappresentazione schematica dei meccanismi cellulari con cui gli astrociti possono controllare la funzione sinaptica. Il glutammato rilasciato a livello sinaptico viene captato dagli astrociti mediante trasportatori specifici e convertito in glutammina dall'enzima glutammina sintetasi. La glutammina quindi viene fornita ai neuroni e riconvertita in glutammato. Il glutammato è cotrasportato insieme allo ione sodio, causando un aumento intracellulare della concentrazione di sodio che porta all'attivazione della pompa Na^+/K^+ -ATPasi. Questa attivazione stimola la glicolisi a livello degli astrociti, con la conseguente produzione di lattato. Il lattato è rilasciato e i neuroni possono utilizzarlo come fonte energetica. Gli astrociti possono anche rilasciare numerosi neurotrasmettitori, tra cui glutammato e ATP, in risposta a stimoli che inducono aumenti dei livelli intracellulari di calcio. Il rilascio di neurotrasmettitori da parte degli astrociti avviene mediante un meccanismo di esocitosi regolata che condivide molte similarità con l'esocitosi neuronale. Gli astrociti, infatti, esprimono le proteine SNARE: sinaptobrevina 2, syntaxina 1 e SNAP 23. Il rilascio di glutammato da parte degli astrociti è bloccato dalla tossina tetanica che taglia la proteina sinaptobrevina 2. GLU: glutammato; GLN: glutammina. (Da: Bacci A, Verderio C, Pravettoni E, Matteoli M. The role of glial cells in synaptic function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;28;354:403-9, modificata)

sinaptica che sono alla base di uno stato patologico. Il riconoscimento del fatto che molti disturbi psichiatrici e neurologici siano "sinaptopatie" rappresenta un importante avanzamento in psichiatria e neurologia e pone in modo definitivo la sinapsi come bersaglio di elezione per il trattamento farmacologico di tali patologie.

È ormai chiaro che anche disfunzioni della funzionalità delle cellule gliali possano causare o contribuire al manifestarsi di patologie neurologiche. Numerose evidenze sperimentali indicano che l'astrogliosi reattiva, caratterizzata da ipertrofia degli astrociti e dal rilascio di mediatori e citochine infiammatorie, favorisce l'ipereccitabilità neuronale e l'insorgenza di scariche epilettiche. Inoltre, da decenni è noto che tutte le principali malattie neurodegenerative e neuroinfiammatorie sono caratterizzate da alterazioni nella funzionalità delle cellule microgliali, le cellule con funzioni immunocompetenti del sistema nervoso. Solo recentemente, tuttavia, l'attività della microglia è stata associata anche a disordini psichiatrici.

La secrezione del neurotrasmettitore

La trasmissione sinaptica è il processo mediante il quale, all'arrivo dell'impulso nervoso (potenziale d'azione), il messaggero chimico (neurotrasmettitore) viene rilasciato dal neurone presinaptico nello spazio sinaptico e va a legarsi e ad attivare i recettori posti sulla membrana del neurone postsinaptico

A livello della terminazione presinaptica, il neurotrasmettitore non è libero nel citoplasma bensì contenuto all'interno di organelli vescicolari, le vescicole sinaptiche, che fondono con la membrana presinaptica in corrispondenza di ispessimenti detti zone attive (vedi **CD**: Approfondimento 32.2. *Organizzazione dinamica dei pool di vescicole sinaptiche*). A livello delle zone attive sono presenti elevate concentrazioni di canali per il Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, deputati alla trasduzione del segnale elettrico in un massiccio influsso di ione Ca^{2+} , che investe le vescicole ivi ancorate, raggiungendo concentrazioni quasi millimolari. Questo scatena l'esocitosi e il rilascio del contenuto delle vescicole nello spazio sinaptico. In virtù del fatto che il rilascio del neurotrasmettitore avviene in seguito alla fusione delle vescicole sinaptiche che immagazzinano un numero relativamente costante di molecole di neurotrasmettitore (detto "quanto", circa 10^3 - 10^4 molecole di neurotrasmettitore), il rilascio del neurotrasmettitore si definisce quantale. Il quanto rappresenta la più piccola quantità di neurotrasmettitore che viene liberato ed evoca un effetto postsinaptico, denominato potenziale in miniatura, di ampiezza riproducibile. A livello postsinaptico, di fronte alle zone attive, sono presenti ispessimenti della membrana postsinaptica (dette densità postsinaptiche) localizzate, nel caso delle sinapsi eccitatorie glutammatergiche, su specializzazioni dendritiche dette "spine". Nonostante la struttura dell'apparato postsinaptico sia differente alla sinapsi eccitatoria rispetto alla quella inibitoria (vedi paragrafo La ricezione del segnale: il

compartimento postsinaptico), in entrambi i tipi di sinapsi, le densità postsinaptiche contengono elevate concentrazioni di recettori per i neurotrasmettitori e di trasduttori del segnale come proteine G eterotrimeriche, enzimi e canali ionici. Questi permettono di convertire il messaggio mediato dal rilascio del neurotrasmettitore chimico in una segnalazione di tipo elettrico (variazione del potenziale elettrico della membrana postsinaptica) o metabolico (Figura 32.3 e Figura 12.1). Questa modalità di trasmissione sinaptica, che avviene rigorosamente lungo circuiti neuronali connessi attraverso sinapsi, è anche denominata *Wiring Transmission* (WT) o trasmissione via cavo. La WT si affianca alla cosiddetta *Volume Transmission* (VT), che consiste nel rilascio di messaggeri chimici negli spazi extracellulari del cervello e nei fluidi cerebrospinali, che possono così diffondere in volumi più ampi per un tempo più lungo, consentendo quindi la segnalazione a un numero elevato di cellule ricettrici.

I messaggeri chimici: neurotrasmettitori, neuropeptidi

I neuroni sono cellule estremamente polarizzate con terminazioni presinaptiche molto distanti dal corpo cellulare, fino a distanze dell'ordine di un metro per i motoneuroni del nervo sciatico nell'uomo. Per garantire un efficiente rifornimento del prodotto di secrezione alle terminazioni nervose, i neuroni utilizzano una strategia particolare, quella di utilizzare come neurotrasmettitori piccole molecole, quali aminoacidi o ammine (i cosiddetti neurotrasmettitori classici) che possono essere sintetizzate in loco da enzimi citoplasmatici presenti a livello delle terminazioni e ricaptate dallo spazio sinaptico dopo l'esocitosi. Inoltre, l'organello di immagazzinamento e liberazione del neurotrasmettitore, la vescicola sinaptica, è in grado di essere riutilizzata più volte mediante un economico ed efficiente ciclo eso-endocitotico (vedi **CD**: Approfondimento 32.3. *Processo di endocitosi delle vescicole sinaptiche*). Queste proprietà rendono la liberazione di neurotrasmettitori classici un processo con caratteristiche uniche rispetto ad altre forme di secrezione regolata presenti in altri tessuti. Grazie all'autonomia funzionale dal corpo cellulare, i neuroni hanno una notevole resistenza all'esaurimento secretorio (fatica) che compare solo in condizione di estrema e prolungata stimolazione. Inoltre, l'esocitosi delle vescicole sinaptiche è un evento estremamente rapido che richiede solamente poche centinaia di microsecondi per arrivare a compimento ed è seguito da un recupero endocitotico caratterizzato da elevatissime efficienza e precisione. Infine, nonostante l'ampiezza costante del potenziale d'azione, la liberazione di neurotrasmettitore è un processo plastico e regolato. I neuroni possono secernere quantità maggiori o minori di neurotrasmettitore in risposta al singolo potenziale d'azione in relazione all'attività precedente della cellula e al particolare ambiente biochimico della terminazione presinaptica. Queste proprietà sono di importanza fondamentale nell'integrazione delle informazioni che avviene a livello sinaptico e nei processi di plasticità sinaptica.

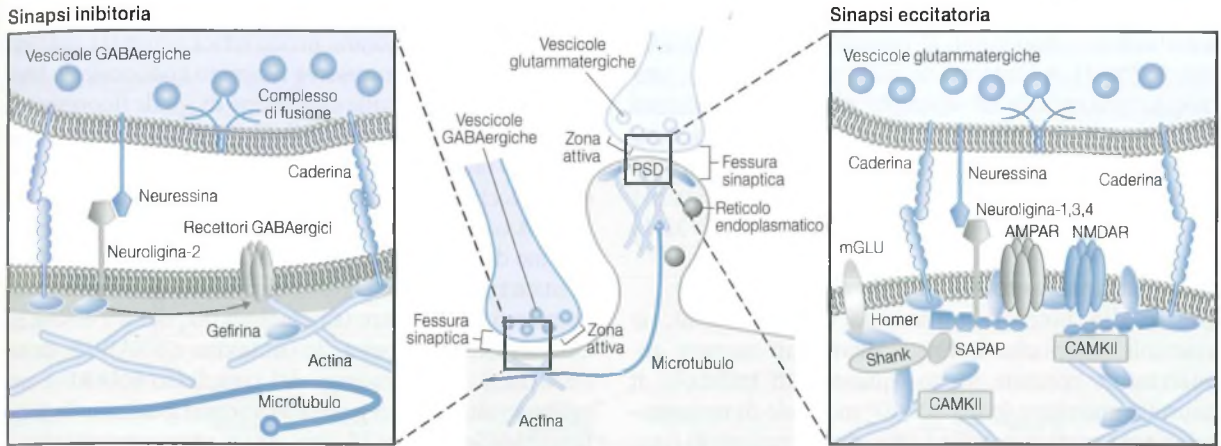


FIGURA 32.3 Rappresentazione schematica di una sinapsi inibitoria (a sinistra) e di una sinapsi eccitatoria (a destra) nel sistema nervoso centrale. Le sinapsi inibitorie ed eccitatorie del SNC esprimono un diverso corredo di proteine specifiche. Le vescicole sinaptiche che contengono il neurotrasmettitore, GABA o glutammato, fondono con la membrana plasmatica a livello della zona attiva. La terminazione presinaptica è separata dal compartimento postsinaptico da una fessura sinaptica (*synaptic cleft*). Numerose proteine di adesione attraversano la fessura sinaptica mantenendo unite e in registro le membrane pre- e postsinaptiche. I recettori dei neurotrasmettitori sono localizzati a livello della membrana postsinaptica, in corrispondenza dei siti di fusione delle vescicole sinaptiche, dove si organizzano in complessi macromolecolari che comprendono anche un grande numero di proteine strutturali (*scaffold*, gefirina, homer, PSD95, shank) e di segnalazione (*signalling*, come CaMKII) costituendo la densità postsinaptica, il cui scopo principale è la ricezione e la trasmissione del segnale. Nel SNC tipicamente le sinapsi glutamatergiche eccitatorie si formano sulle spine dendritiche, mentre le sinapsi GABA-ergiche inibitorie si possono trovare direttamente sul ramo dendritico o sul soma. PSD: *PostSynaptic Density*, densità postsinaptica; mGLU: recettori metabotropici del glutammato; AMPAR: recettori AMPA; NMDAR: recettori NMDA. (Da: McAllister AK. Dynamic aspects of CNS synapse formation. *Annu Rev Neurosci* 2007;30:425:50)

Un discorso a parte meritano i neuropeptidi, prodotto di secrezione di natura proteica, che svolgono un ruolo cruciale in una vasta gamma di processi biologici che vanno dalla degradazione della matrice extracellulare, alla sopravvivenza neuronale, alla trasmissione sinaptica fino ai fenomeni di apprendimento. La strategia utilizzata dal neurone è diversa: i peptidi vengono sintetizzati nel corpo cellulare, immagazzinati in vescicole grandi morfologicamente distinte e trasportati in esse alla periferia. Questa strategia implica un diverso utilizzo di questi neurotrasmettitori (vedi CD: Approfondimento 32.4. *Secrezione dei neuropeptidi*).

Le vescicole sinaptiche

Granuli di secrezione e vescicole sinaptiche

Sia i neurotrasmettitori classici che i neuropeptidi sono immagazzinati in vescicole da cui vengono liberati nello spazio extracellulare in seguito a un aumento della concentrazione citosolica di Ca^{2+} . Tuttavia, i due tipi di neurotrasmettitore sono immagazzinati in organelli distinti per morfologia, ciclo cellulare e modalità di secrezione. I neurotrasmettitori classici (acido glutammico, glicina, GABA, acetilcolina e ammine biogene) sono immagazzinati in vescicole sinaptiche piccole (con un diametro sorprendentemente omogeneo di 40-50 nm) che sono accumulate in grande numero nelle terminazioni nervose, raggruppate in prossimità delle zone attive, dove avviene preferenzialmente la liberazione del neurotrasmettitore. I

neuropeptidi sono invece contenuti, da soli o in presenza di neurotrasmettitori classici, in vescicole secretorie di maggiori ed eterogenee dimensioni (100-300 nm di diametro) che mostrano un contenuto elettrondenso dovuto all'alta concentrazione di proteine (vescicole sinaptiche grandi a nucleo denso) (Figura 32.2). Le vescicole sinaptiche grandi a nucleo denso, di seguito chiamate granuli di secrezione, diversamente dalle vescicole sinaptiche piccole, di seguito chiamate vescicole sinaptiche, vengono prodotte a livello del corpo cellulare e possono andare incontro a fusione con la membrana plasmatica a livello di vari distretti del neurone, incluso il corpo cellulare, i dendriti e l'assone. È interessante notare che, mentre esiste una stretta corrispondenza tra neurotrasmettitori classici (a livello presinaptico) e loro recettori (a livello postsinaptico), si ritrova spesso una mancanza di corrispondenza anatomica, a livello cerebrale, tra localizzazione dei neuropeptidi e dei loro recettori ("mismatch"), che rappresenta un'ulteriore prova dell'azione a distanza di questo tipo di neurotrasmettitori, tipica della trasmissione endocrina/paracrina. Per questi motivi, si può generalizzare che mentre le VS sono gli organelli responsabili della WT, una segnalazione spazialmente ben definita (con le eccezioni prima riportate), i granuli di secrezione si ritiene siano responsabili della VT, la modalità di trasmissione spazialmente non definita. Nella terminazione presinaptica, le vescicole sinaptiche sono organizzate in diversi gruppi funzionali: in parte sono immobilizzate nella densa matrice citoscheletrica della terminazione, formata principalmente da actina e

spectrina (gruppo di riserva, *reserve pool*); le rimanenti sono mobili e disponibili al rilascio (gruppo di riciclo, *recycling pool*). All'interno di quest'ultimo gruppo, una piccola percentuale di vescicole si trova già ancorata alla zona attiva e prende il nome di gruppo di pronto rilascio (*readily releasable pool*) (vedi CD: Approfondimento 32.2). Un'organizzazione analoga è stata dimostrata per i granuli di secrezione (vedi CD: Approfondimento 32.4).

Immagazzinamento del neurotrasmettitore

Grazie alla notevole uniformità di dimensioni, le vescicole sinaptiche immagazzinano un numero relativamente costante (detto "quanto") di molecole di neurotrasmettitore (circa 10^3 - 10^4 molecole di neurotrasmettitore, corrispondente a una concentrazione di circa 100 mM). Il quanto rappresenta quindi la più piccola quantità di neurotrasmettitore che può essere liberata ed evoca un effetto postsinaptico, denominato potenziale in miniatura, di ampiezza notevolmente riproducibile. Il riempimento delle vescicole sinaptiche è un processo di trasporto attivo in cui il neurotrasmettitore viene internalizzato contro gradiente di concentrazione. Una pompa protonica elettrogenica (un'ATPasi che trasporta ioni H^+ all'interno della vescicola) è responsabile della creazione di un gradiente elettrochimico tra citoplasma e interno della vescicola. La pompa protonica crea un potenziale transmembrana con l'interno della vescicola positivo rispetto all'esterno. Studi recenti hanno dimostrato che, al contrario di altre proteine che sono presenti sulla membrana delle vescicole sinaptiche in numerose copie, la pompa protonica è presente sulle vescicole in unica copia. Il gradiente elettrochimico generato dalla pompa viene quindi utilizzato per il trasporto attivo del neurotrasmettitore a opera di trasportatori specifici per ammine biogene, acetilcolina, acido glutammico e GABA/glicina. I neurotrasmettitori vengono immagazzinati nelle vescicole secretorie in elevata concentrazione, in associazione con Ca^{2+} , ATP e, soprattutto nel caso dei neurotrasmettitori peptidici, proteine e proteoglicani. Questi componenti sembrano avere il ruolo di ridurre l'osmolarità del contenuto delle vescicole di secrezione (impedendone quindi il rigonfiamento osmotico) e di permettere al trasportatore un più efficiente lavoro contro gradiente (diminuendo la concentrazione della frazione libera di trasmettitore) (vedi anche Capitolo 24).

Ciclo di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche

Il processo di esocitosi

Il complesso processo di liberazione del neurotrasmettitore avviene attraverso il susseguirsi di vari processi, che includono uno stadio preparatorio di liberazione delle vescicole sinaptiche dal sequestro operato dal citoscheletro, a sua volta seguito da una sequenza di reazioni "obbligatorie" comprendenti l'indirizzamento e l'ancoraggio alle zone attive della membrana presinaptica,

la predisposizione alla fusione (priming o emifusione), la fusione con la membrana presinaptica scatenata dall'ingresso di Ca^{2+} e il successivo recupero endocitotico. Mediante studi basati sulla captazione di sonde fluorescenti extracellulari, si è potuto stabilire che il tempo che una vescicola sinaptica impiega per compiere un intero ciclo eso-endocitotico è dell'ordine di 1-2 minuti (Figura 32.4). In particolare, il processo di ancoraggio, emifusione e fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana plasmatica richiede l'intervento di proteine specifiche della membrana vescicolare (sinaptobrevina, detta v-SNARE) e della membrana bersaglio (syntaxina e SNAP-25, dette t-SNAREs). La formazione del complesso SNARE è un processo altamente regolato, a cui contribuiscono le proteine SM (Sec1/Munc18-like), che si ritiene organizzino i complessi trans-SNARE spazialmente e temporalmente, e le complexine, che stabilizzano il complesso nello stato metastabile di emifusione, finché l'ingresso di Ca^{2+} all'interno della terminazione non induce il processo di fusione vera e propria. Il Ca^{2+} si lega alla sinaptotagmina, una proteina integrale delle vescicole sinaptiche con la funzione di sensore citosolico per il Ca^{2+} . La sinaptotagmina è in grado di interagire con il complesso SNARE così come con i fosfolipidi acidi presenti nel foglietto citosolico della membrana presinaptica, in maniera Ca^{2+} -dipendente. Questa interazione destabilizza il complesso di emifusione, provocando la fusione completa della vescicola sinaptica con la membrana, con conseguente liberazione di neurotrasmettitore. Per le vescicole del gruppo di riserva, l'interazione con il citoscheletro è mediato dalla famiglia delle sinapsine, proteine associate alle vescicole sinaptiche che interagiscono con l'actina e che si dissociano in seguito alla loro fosforilazione da parte di proteinchinasi. Lo stato di fosforilazione delle sinapsine (a sua volta regolato dai livelli intraterminali di Ca^{2+}) contribuisce quindi a regolare la disponibilità delle vescicole sinaptiche per il processo di fusione. I dettagli del ciclo di esocitosi delle vescicole sinaptiche sono riportati nel CD.

È importante notare che, nonostante la ricerca si sia concentrata sulle proteine sinaptiche coinvolte nella fusione e nell'endocitosi delle vescicole, è ormai chiaro che anche l'ambiente lipidico all'interno del quale le proteine agiscono, giochi un ruolo chiave nella modulazione della trasmissione nervosa. I lipidi controllano la funzionalità sinaptica legandosi a regioni presenti in proteine sinaptiche che controllano gli stadi di pre-fusione, tra cui la sinaptotagmina. Inoltre modifiche post-traduzionali delle proteine sinaptiche come la palmitoilazione o la coniugazione ad altri acidi grassi rappresentano un importante meccanismo di regolazione dell'esocitosi (vedi CD: Approfondimento 32.5. *Ruolo dei lipidi nella regolazione del ciclo di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche*).

Il processo di endocitosi

Le proteine e i lipidi che compongono la vescicola sinaptica devono essere recuperati dalla membrana plasmatica in seguito all'esocitosi e reincorporati in nuove vescicole che poi vengono riempite con il neurotrasmettitore.

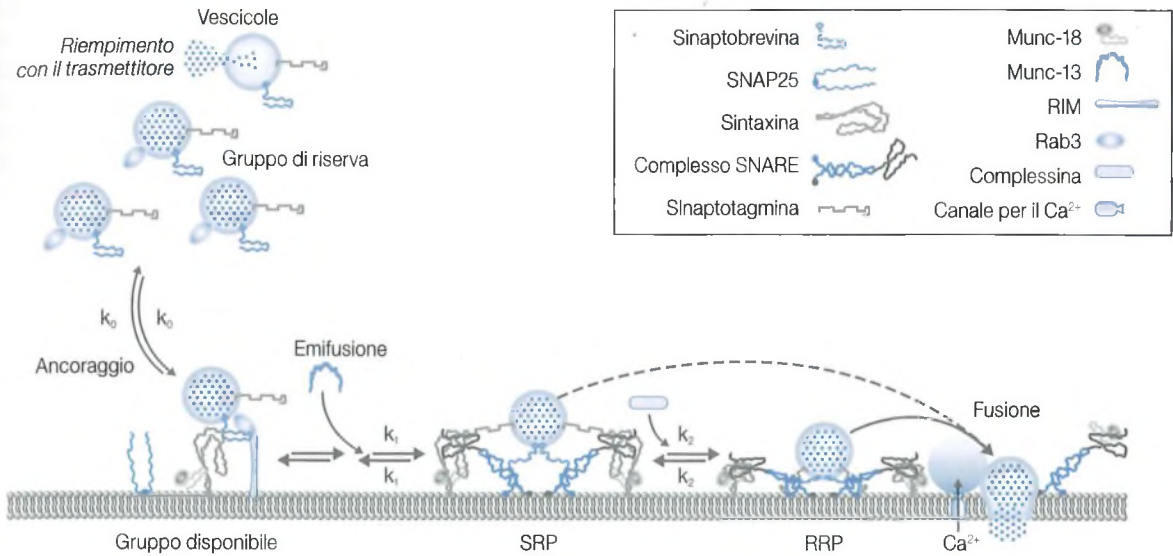


FIGURA 32.4 Meccanismi e proteine coinvolti nel processo di neurosecrezione e recupero dei componenti delle vescicole sinaptiche. Le vescicole sinaptiche interagiscono durante il processo di esocitosi calcio-dipendente con la membrana presinaptica. Sono indicate le principali proteine delle vescicole sinaptiche e della membrana plasmatica che interagiscono e promuovono il processo di fusione. Una cascata di eventi molecolari controlla gli eventi che culminano con l'esocitosi delle vescicole sinaptiche in seguito all'aumento della concentrazione intracellulare di calcio. Il processo di ancoraggio (*docking*) rappresenta il trasferimento delle vescicole dal gruppo di riserva al gruppo disponibile (UPP) e il loro ancoraggio alla zona attiva. Il processo di priming corrisponde al trasferimento delle vescicole dal gruppo disponibile al gruppo di rilascio e la formazione del complesso SNARE che porta la vescicola in stretto contatto con la membrana presinaptica (emifusione). Le proteine Munc-18 e Munc-13 regolano questi processi favorendo rispettivamente il processo di ancoraggio e di priming. Le complessine favoriscono il processo di emifusione. La fusione delle vescicole con la membrana è innescata dal legame del calcio al suo sensore, la proteina sinaptotagmina. Le principali proteine delle vescicole sinaptiche e della membrana presinaptica sono schematicamente rappresentate (vedi inserto nella figura). Per ulteriori dettagli, vedi testo. RRP: *Ready Releasable Pool*, gruppo di pronto rilascio; SRP: *Slowly Releasable Pool*, gruppo di lento rilascio. (Da: Becherer U, Rettig J. Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 2006;326:393-407)

Questo avviene attraverso un meccanismo selettivo di recupero di questa membrana, chiamato endocitosi (Figura 32.4). Nel 1973 Heuser e Reese dimostrarono per la prima volta il ciclo delle vescicole sinaptiche mediante la captazione di una soluzione extracellulare di perossidasi. L'introduzione recente dei traccianti ottici e il successivo uso di sonde proteiche sensibili al pH (pHluorin) hanno fornito un enorme aiuto per lo studio del processo di endocitosi anche a livello delle piccole terminazioni sinaptiche, consentendo di monitorare specificamente il destino delle vescicole sinaptiche e di visualizzare il processo di endocitosi anche in seguito a un unico potenziale d'azione.

È oggi noto che il recupero delle vescicole sia mediato dalla proteina clatrina, una proteina formata da tre catene pesanti e da tre catene leggere, organizzate a formare strutture dette triskelions; queste strutture avvolgono le vescicole in via di recupero dalla membrana plasmatica con una struttura a canestro, generando le cosiddette fossette endocitiche rivestite di clatrina. Dal punto di vista anatomico-strutturale, le fossette rivestite di clatrina si trovano alle estremità laterali della zona attiva, lontano cioè dalle porzioni della membrana presinaptica specializzate per la fusione delle vescicole sinaptiche. Queste regioni della terminazione sono definite "aree di endocitosi" e sono caratterizzate dall'abbondanza di

actina. Il processo di fissione delle vescicole rivestite da clatrina dalla membrana plasmatica coinvolge una serie di proteine, tra cui la GTPasi dinamina e la fosfatasi dei polifosfoinositidi sinaptotagmina (vedi CD: Approfondimento 32.3). In seguito alla fissione dalla membrana, le vescicole rivestite di clatrina possono fondere con endosomi, da cui vengono rigenerate nuove vescicole, oppure perdere direttamente il rivestimento, in assenza di passaggio attraverso l'endosoma; in entrambi i casi, la vescicola recuperata è acidificata attraverso la pompa protonica, processo seguito dal suo riempimento con neurotrasmettitore neosintetizzato.

È interessante notare che le fossette rivestite di clatrina sono molto rare nei terminali sinaptici a riposo, mentre diventano numerose in seguito a processi di esocitosi massiva. Questa evidenza ha suggerito a Bruno Ceccarelli, la possibilità di un meccanismo di esocitosi alternativo, denominato di "kiss and run", che potrebbe essere predominante in condizioni fisiologiche di stimolazione. Secondo questo meccanismo, le vescicole liberano il proprio contenuto attraverso un poro di fusione, in assenza di fusione completa con la membrana presinaptica e vengono quindi recuperate rapidamente mediante la chiusura del poro di fusione e la dissociazione delle due membrane. Il meccanismo di "kiss and run" consente un notevole risparmio energetico e temporale (Figura 32.4).

Esiste anche la possibilità che la vescicola non si allontani dalla membrana e venga riempita di NT direttamente "sul posto"; questo meccanismo ancora poco caratterizzato è definito "kiss and stay".

Il destino del neurotrasmettitore

Il neurotrasmettitore liberato nel vallo sinaptico, oltre a combinarsi con i recettori specifici può subire uno o più dei seguenti destini che mirano sia ad abbassarne la concentrazione (promuovendone la dissociazione dai recettori e la cessazione dell'azione postsinaptica) che a economizzare neurotrasmettitore (diminuendo il consumo energetico per la biosintesi).

- Il neurotrasmettitore (o parte della sua molecola, come nel caso della colina, prodotto del catabolismo dell'acetilcolina) può essere ricaptato all'interno della terminazione nervosa per essere riutilizzato in successivi cicli secretori. È il meccanismo più importante per la cessazione dell'azione del neurotrasmettitore. Questa ricaptazione avviene a opera di trasportatori presenti sulla membrana plasmatica. Una volta internalizzato nel citoplasma, il neurotrasmettitore può essere nuovamente immagazzinato all'interno delle vescicole sinaptiche a opera di specifici trasportatori vescicolari o essere metabolizzato.
- Il neurotrasmettitore può essere ricaptato ed essere successivamente metabolizzato da parte delle cellule gliali.
- Il neurotrasmettitore può essere metabolizzato nello spazio intersinaptico, come nel caso dell'acetilcolina. Per questo neurotrasmettitore, il processo di metabolismo rappresenta il meccanismo principale per la terminazione della sua azione.

È importante notare che molti farmaci che vengono utilizzati per il trattamento di patologie psichiatriche, neurologiche o malattie neurodegenerative agiscono proprio sui meccanismi di ricaptazione e metabolismo del neurotrasmettitore. Tra questi vale la pena di ricordare i farmaci antidepressivi, che agiscono inibendo la ricaptazione di serotonina e/o noradrenalina o la loro degradazione, i farmaci per il trattamento della malattia di Alzheimer, che inibiscono la degradazione dell'acetilcolina aumentandone la disponibilità nel vallo sinaptico, e alcuni farmaci antiepilettici, che inibiscono la ricaptazione del neurotrasmettitore GABA o la sua degradazione da parte del neurone e delle cellule gliali (vedi Capitoli 24, 33, 34, 37, 38).

Il destino dei neuropeptidi liberati è profondamente diverso da quello dei neurotrasmettitori classici in quanto il rilascio avviene in genere al di fuori dello spazio sinaptico (rilascio parasinaptico), direttamente nello spazio extracellulare e non esistono trasportatori in grado di ricaptare i neuropeptidi all'interno della terminazione. Per tali ragioni, il destino dei neuropeptidi rilasciati è duplice: diffusione extrasinaptica e metabolismo extraneuronale a opera di peptidasi. Ambedue questi processi hanno importanti implicazioni funzionali. Il metabolismo a opera

di peptidasi può, da un lato inattivare biologicamente il peptide, ma anche derivarne frammenti ancora dotati di attività biologica a volte differente rispetto al peptide rilasciato. La diffusione dei neuropeptidi nel liquido extracellulare dà loro l'opportunità di agire a distanza, con modalità paracrina, a livello di recettori extrasinaptici ad alta affinità (VT).

La ricezione del segnale: il compartimento postsinaptico

Nella sinapsi formata tra due neuroni il sito specializzato per ricezione ed elaborazione del segnale è denominato compartimento postsinaptico. L'azione del trasmettitore nel compartimento postsinaptico non dipende dalle proprietà chimiche del trasmettitore bensì dalle proprietà dei recettori che esso riconosce e lega. Ad esempio, l'acetilcolina può eccitare alcuni neuroni e inibirne altri o addirittura in taluni casi causare sia eccitazione che inibizione. È quindi il recettore che determina se una sinapsi colinergica sia eccitatoria o inibitoria e se un canale ionico sia direttamente attivato dal trasmettitore (risposta elettrica) o indirettamente mediante secondi messaggeri (risposta metabolica o metabotropica).

Tutti i recettori dei neurotrasmettitori hanno in comune due caratteristiche biochimiche:

1. sono delle proteine integrali di membrana; la regione extracellulare riconosce e lega il neurotrasmettitore rilasciato dalla cellula presinaptica;
2. causano un effetto biologico nella cellula postsinaptica; tipicamente influenzano direttamente o indirettamente l'apertura e la chiusura dei canali ionici, oppure inducono modificazioni metaboliche complesse (vedi Capitolo 6).

Nel cervello un neurone riceve connessioni da centinaia di altri neuroni; queste connessioni sono sia eccitatorie che inibitorie, per cui un singolo neurone è continuamente bombardato da segnali mediati da neurotrasmettitori diversi che alterano l'attività di canali ionici diversi. Quindi un neurone del SNC deve integrare i diversi segnali che riceve in una risposta coordinata. Le sinapsi del SNC sono modestamente efficienti, cioè gli stimoli prodotti da un singolo neurone presinaptico sono spesso insufficienti a generare nel neurone un potenziale di azione. La risposta del neurone postsinaptico dipende dall'insieme degli stimoli che il neurone riceve dai diversi neuroni con cui è in contatto sinaptico ed è influenzata da parecchi fattori tra cui la localizzazione, le dimensioni e la forma della sinapsi, la vicinanza e la relativa forza di altre sinapsi vicine. Il processo mediante il quale il neurone postsinaptico integra i segnali sinaptici è chiamato integrazione neuronale.

Tutti e quattro i compartimenti del neurone – assone, terminazioni, corpo cellulare e dendriti – possono fungere da siti presinaptici e postsinaptici. Tuttavia più comunemente i contatti sinaptici che si formano sono asso-assonici, asso-somatici e asso-dendritici. I contatti

asso-dendritici possono stabilirsi tra una terminazione assonica e il ramo del dendrite oppure la spina dendritica. La vicinanza di una sinapsi alla regione del neurone postsinaptico dove si innesca il potenziale di azione (*axon hillock*) ha un'influenza maggiore sulla risposta del neurone postsinaptico rispetto alle sinapsi localizzate sull'albero dendritico distale. Le sinapsi localizzate sul corpo cellulare sono inibitorie, mentre le sinapsi sulle spine dendritiche sono spesso eccitatorie.

Come si è già detto, i protagonisti principali del compartimento postsinaptico sono i recettori, che hanno due funzioni principali: il riconoscimento di specifici neurotrasmettitori e l'attivazione degli effettori (vedi anche Capitolo 6). In particolare, l'attivazione di recettori ionotropici causa una trasmissione sinaptica veloce, che ha una durata di soli pochi millisecondi. Gli effetti più duraturi dei neurotrasmettitori sono mediati invece da recettori accoppiati a proteine G (recettori metabotropici) e recettori tirosinchinasici. La cascata di eventi innescata dai secondi messaggeri può culminare anche in cambiamenti dell'espressione genica, i cui effetti possono durare giorni o addirittura settimane.

Formazione, mantenimento e plasticità della sinapsi

La capacità di propagare informazioni del sistema nervoso, si fonda sulla corretta formazione di connessioni neuronali

La crescita dell'assone e la sinaptogenesi sono due processi distinti ma strettamente correlati, che sono essenziali per la formazione di contatti funzionali durante lo sviluppo del cervello. La traiettoria tracciata dal cono di crescita assonale attraverso il microambiente fino al raggiungimento dell'area bersaglio può essere suddivisa in diversi segmenti, definiti dal contatto dell'assone con cellule guida, gliali, che rilasciano diverse molecole chemo-attraenti o chemo-repellenti. Queste molecole favoriscono e inibiscono rispettivamente la crescita dell'assone e lo guidano attraverso un ambiente costituito da elementi cellulari eterogenei fino al contatto con l'appropriato bersaglio neuronale. Una volta raggiunto il neurone bersaglio, la terminazione dell'assone inizia a ramificarsi in molteplici strutture sottili, dando inizio alla sinaptogenesi (Figura 32.5). Nel sistema nervoso centrale dei mammiferi, l'apparato postsinaptico immaturo protrude inizialmente dalla superficie dei dendriti sotto forma di filopodi sottili, ricchi di actina. I filopodi evolvono poi in spine mature e funzionali attraverso riarrangiamenti del citoscheletro e il reclutamento di componenti postsinaptici. Questo processo avviene parallelamente alla elaborazione delle terminazioni assonali presinaptiche che accompagna la stabilizzazione dei contatti intercellulari in sinapsi mature. Studi recenti suggeriscono come le molecole coinvolte nel direzionare la crescita assonale contribuiscano anche alle fasi di sinaptogenesi successive alla formazione del contatto,

regolando le dinamiche del citoscheletro e favorendo il reclutamento di componenti al sito pre- e postsinaptico per la formazione del macchinario di neurotrasmissione. Altre molecole, attivate in seguito alla formazione del contatto sinaptico, concorrono poi alla stabilizzazione, all'espansione e alla maturazione della sinapsi. Queste molecole comprendono le semaforine transmembrana, i recettori tirosinchinasici che legano la molecola associata alla membrana efrina e diverse classi di proteine di adesione, tra cui il complesso neuroligine-neurexine, le proteine ricche in sequenze di leucine (*Leucine Rich Repeats*, LRR protein), membri della famiglia delle Ig, la famiglia delle SynCAM (*Synaptic Adhesion Proteins*), le caderine. L'adesione tra le neuroligine postsinaptiche e le neurexine presinaptiche costituisce l'interazione più studiata tra le proteine di adesione coinvolte nella sinaptogenesi. Quando espresse in cellule non neuronali, le neuroligine e le neurexine inducono il differenziamento del compartimento presinaptico e postsinaptico in assoni e dendriti di neuroni ippocampali, co-coltivati con le cellule esprimenti le proteine di adesione. L'interazione della neuroligina con la proteina postsinaptica PSD-95 consente l'accoppiamento della proteina di adesione agli elementi postsinaptici, permettendo al segnale attivato dall'interazione transinaptica di propagare all'interno della spina dendritica (Figura 32.3).

Lo sviluppo corretto dei contatti sinaptici e di appropriati modelli di connettività è cruciale per l'assemblamento di circuiti neuronali funzionali. Alterazioni nella formazione dei contatti sinaptici possono infatti causare disordini neuropsichiatrici, come il ritardo mentale e l'autismo, e probabilmente giocare un ruolo anche in disordini neurodegenerativi come la demenza di Alzheimer. A oggi, mutazioni nella neurexina 1 e nelle neuroligine 3 e 4 sono state associate con l'autismo e il ritardo mentale. Inoltre anche SHANK3, una proteina che interagisce con neuroligina e svolge un ruolo strutturale nel mantenimento del compartimento postsinaptico è stata associata all'autismo. Infine più di 140 mutazioni diverse in L1-CAM sono state associate con disordini neurologici, incluso il ritardo mentale (Tabella 32.1). Per questo motivo lo studio delle proteine coinvolte nella sinaptogenesi può anche servire per definire i meccanismi patogenetici di alcuni disordini neurologici.

La maturazione delle sinapsi è seguita durante lo sviluppo post-natale del sistema nervoso centrale dalla retrazione di alcuni contatti sinaptici. In questa fase, le sinapsi funzionalmente importanti vengono rafforzate e quelle meno rilevanti vengono indebolite per poi essere eliminate. L'eliminazione delle sinapsi ridondanti costituisce la fase terminale della formazione delle reti neuronali. Anche alterazioni in questo stadio di perfezionamento dei circuiti possono essere alla base di disordini psichiatrici, quali casi di schizofrenia a esordio adolescenziale. Recentemente è stato dimostrato che un difetto, geneticamente determinato nel processo di eliminazione dei contatti ridondanti e la persistenza di iperconnettività nel cervello adulto causano un eccesso di attività di scarica sincrona tra gruppi di neuroni e comparsa di attività epilettica.

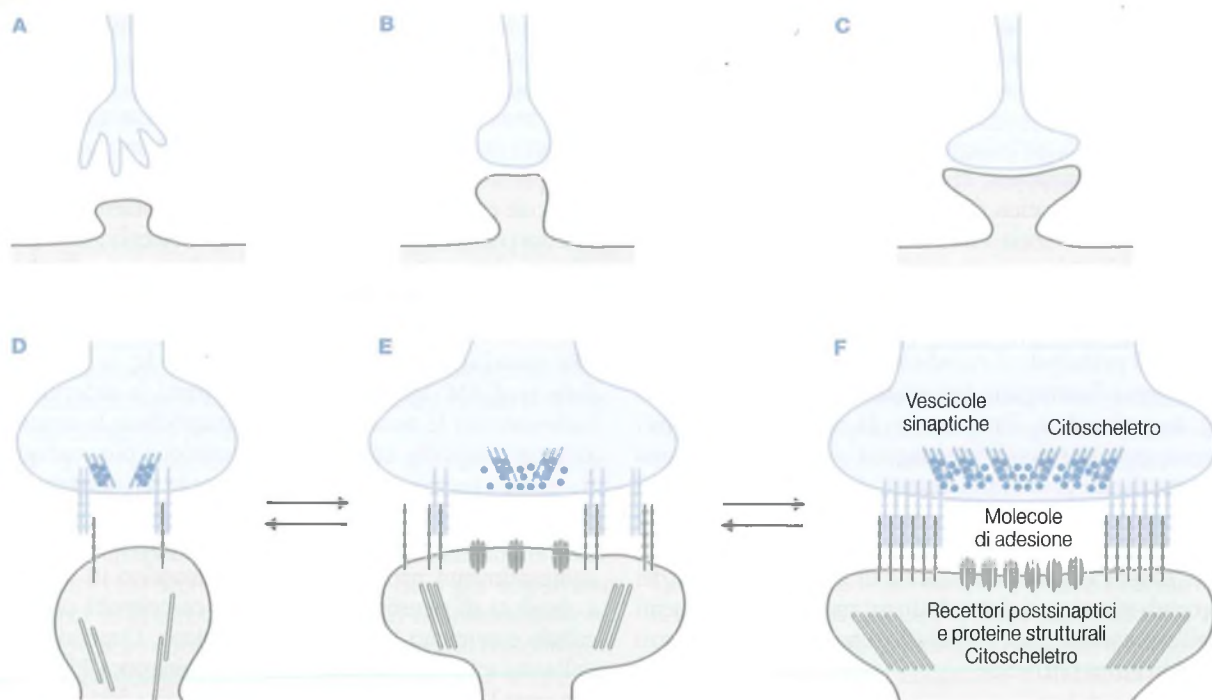


FIGURA 32.5 Rappresentazione schematica della formazione (A-C) e della maturazione del contatto sinaptico (D-F). **A.** Scelta del sito dove avverrà la sinapsi. **B.** Formazione del contatto sinaptico. **C.** Maturazione della sinapsi. **D-F.** Ruolo delle molecole di adesione cellulare nella sinaptogenesi: N-caderina e catenine regolano la morfologia e la forza delle spine dendritiche. A stadi precoci di sviluppo le spine dendritiche hanno tipicamente una morfologia allungata e sono altamente mobili (D). I contatti sinaptici vengono poi stabilizzati mediante il reclutamento di molecole di adesione cellulare. Le interazioni tra molecole di adesione presenti nella membrana pre- e postsinaptica attivano cascate di segnalazione intracellulare e secondi messaggeri specifici che possono modificare l'organizzazione dei recettori e del citoscheletro sinaptico (E). Questa serie di eventi regola la maturazione della sinapsi ed è anche alla base della plasticità sinaptica (F). Vedi testo per ulteriori dettagli. (Da: Giagtzoglou N, Ly CV, Bellen HJ. Cell adhesion, the backbone of the synapse: "Vertebrate" and "Invertebrate". Cold Spring Harb Perspect Biol 2009;1:a003079. Review)

TABELLA 32.1 Alcune proteine sinaptiche coinvolte in sinaptopatie

Gene	Proteina	Funzione	Patologia (selezione)
Cplx1	Complexin-1	TR	HD, SCH
Cplx2	Complexin-2	TR	HD, SCH
Sx1p1	Munc18-1	TR	AD, EPI
Pclo	Piccolo	TR	DEP
SNAP25	SNAP25	TR	ADHD, SCH
Nrxn1	Neurexin-1	SG	AUT, SCH
Nlgn3	Neuroigin-3	SG, RF, ICF	
Nlgn4	Neuroigin-4	SG, RF, ICF	AUT, MR, TOU
Dlg2	PSD-93	SG, RF, ICF	SCH, MR
Dlg3	SAP-102	SG, RF, ICF	SCH, MR
Dlg4	PSD-95	SG, RF, ICF	SCH, MR
Grin2B	NMDA-R2B	RF	AD, ADHD, BIP, DEP, SCH
Shank3	SHANK-3	SG, RF	AUT

AD: malattia di Alzheimer; ADHD: sindrome da deficit di attenzione e iperattività; AUT: autismo; BIP: disordine bipolare; DEP: depressione; EPI: epilessia; HD: patologia di Huntington; ICF: funzione di canale ionico; MR: ritardo mentale; RF: funzione di recettore; SCH: schizofrenia; SG: sinaptogenesi; TOU: sindrome di Tourette; TR: rilascio di neurotrasmettitore.

I contatti sinaptici rimangono delle strutture plastiche anche a completamento della loro maturazione nel cervello adulto. Da molto tempo si ritiene che proprio la plasticità sinaptica e cambiamenti strutturali nei circuiti neuronali siano alla base del funzionamento del cervello e della memoria e dell'apprendimento. Solo recentemente, però, grazie all'avvento di nuovi strumenti di imaging cellulare (microscopia a 2 fotoni) e all'utilizzo di linee di topi trasgenici che esprimono proteine fluorescenti (ad esempio, la *Green Fluorescence Protein*, GFP), l'analisi della morfologia dei terminali assionali e delle spine nel cervello di animali in vivo ha direttamente dimostrato che le strutture sinaptiche vanno incontro a un processo di rimodellamento durante l'apprendimento o in seguito a esperienze sensoriali. Questi studi hanno evidenziato che l'apprendimento di un compito motorio, l'esposizione a un ambiente arricchito o stimoli visivi inducono nell'arco di ore la comparsa di spine in aree specifiche della corteccia cerebrale. A seconda dei protocolli di stimolazione, queste modifiche sinaptiche hanno una durata diversa nel tempo. In alcuni casi rimangono per lungo tempo, ma più frequentemente il numero totale delle spine ritorna ai valori di controllo nelle due settimane successive alla fase di apprendimento, grazie a un aumento della velocità di eliminazione.

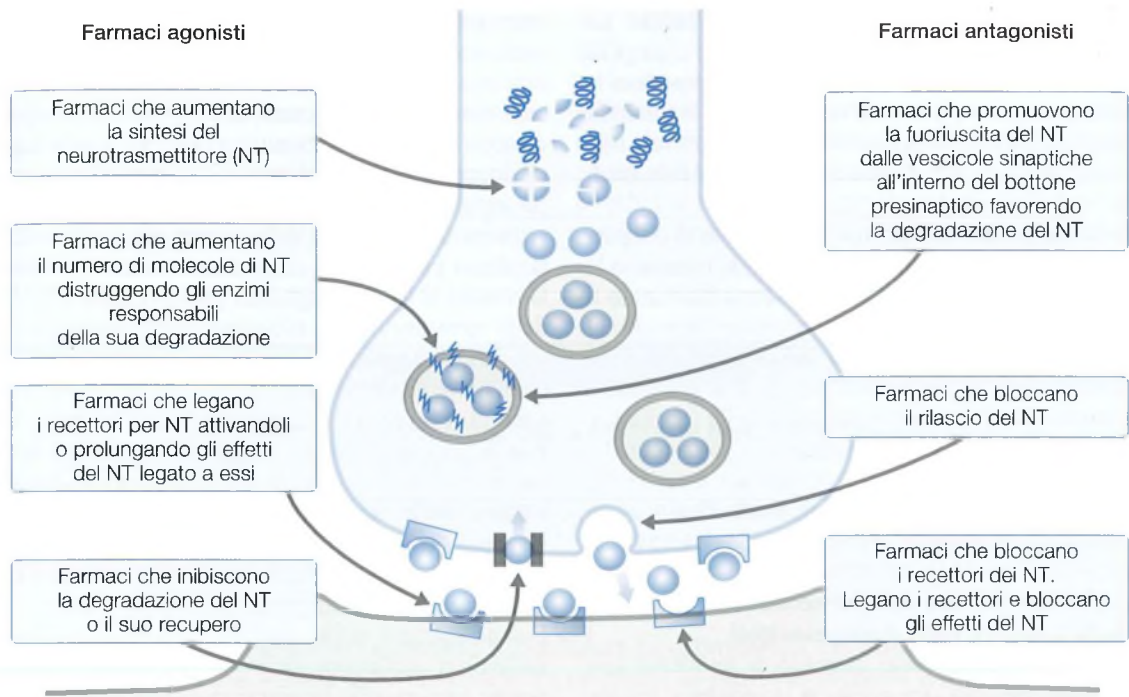


FIGURA 32.6 Rappresentazione schematica di alcuni meccanismi d'azione dei farmaci attivi a livello della sinapsi. Tra le principali categorie di farmaci che sono correntemente utilizzati in clinica per la cura di patologie neurologiche e psichiatriche si annoverano: farmaci con azione agonistica o stimolatori che agiscono aumentando la sintesi del neurotrasmettitore o inibendo la sua degradazione, oppure farmaci che attivano i recettori per i neurotrasmettitori; farmaci con azione antagonista o inibitori che agiscono favorendo la degradazione del neurotrasmettitore a livello della terminazione presinaptica o che ne bloccano il rilascio, oppure farmaci che inibiscono i recettori dei neurotrasmettitori.

Sebbene non sia ancora stata dimostrata completamente la necessità di questa plasticità strutturale per l'acquisizione di nuove abilità e il mantenimento della memoria, le innumerevoli evidenze che si sono finora accumulate supportano fortemente il ruolo fondamentale della plasticità strutturale delle spine in questi fenomeni.

Farmacologia della neurosecrezione

La farmacologia della sinapsi si identifica quasi completamente con la neurofarmacologia, essendo la sinapsi il bersaglio preferenziale dei farmaci attivi sul sistema nervoso

Verranno qui illustrati esclusivamente i farmaci che agiscono sul processo di rilascio di neurotrasmettitore (Figura 32.6), mentre si rimanda ai capitoli specifici per i farmaci attivi sulla sintesi e sul metabolismo dei neurotrasmettitori, sui loro recettori e sui processi di trasduzione intracellulare.

Farmaci che interferiscono con il trasporto delle vescicole di secrezione

I granuli e le vescicole di secrezione (o i loro precursori) vengono trasportati dal corpo cellulare alle terminazioni nervose mediante un movimento attivo lungo i microtubuli. È quindi evidente che tutte quelle sostanze che interfe-

riscono con la dinamica dei microtubuli causeranno anche un blocco dell'esocitosi. Tra queste sostanze ricordiamo la colchicina, il nocodazolo, il taxolo e gli alcaloidi della vinca (vincristina). La brefeldina A è un metabolita fungino che ha drammatici effetti sui processi di secrezione. Il farmaco, infatti, inibisce la secrezione e causa notevoli cambiamenti nell'aspetto del sistema di endomembrane della cellula, disintegrando l'apparato di Golgi formando lunghe strutture tubulari. Inoltre, la brefeldina A interferisce anche con la via endocitotica, interferendo con la formazione del rivestimento di clatrina. A causa dei marcati effetti sulla secrezione da cellule eucariotiche, la brefeldina A, che era stata inizialmente studiata come antibiotico, non viene utilizzata in terapia. Si è però rivelata un utile strumento per lo studio dei principi che sottendono alla biogenesi e al trasporto degli organelli secretivi.

Farmaci che interferiscono con l'immagazzinamento del trasmettitore nelle vescicole

Poiché l'immagazzinamento del neurotrasmettitore nelle vescicole sinaptiche richiede l'acidificazione vescicolare, le sostanze che interferiscono con il funzionamento della pompa protonica impediscono il caricamento del trasmettitore nella vescicola. Tra queste sostanze si ricorda la bafilomicina, un antibiotico macrolide derivante dallo *Streptomyces griseus*, che inibisce in modo specifico il funzionamento della ATPasi vacuolare,

impedendo quindi la riacidificazione vescicolare. La bafilomicina, che è utilizzata essenzialmente a scopi di ricerca, dissipando l'acidità intravescicolare, impedisce la dissociazione e il trasferimento nel citosol della subunità catalitica delle tossine tetanica o botulinica, prevenendo così l'azione proteolitica sulle proteine SNAREs (vedi oltre).

Tra le sostanze che inibiscono direttamente il trasportatore vescicolare dei neurotrasmettitori, si ricordano la reserpina e la tetrabenazina, che agiscono bloccando il trasportatore vescicolare delle monoamine, deputato al trasporto di noradrenalina, serotonina e dopamina nelle vescicole sinaptiche. Per questa proprietà la reserpina è stata in passato ampiamente utilizzata nella terapia farmacologica dell'ipertensione e di alcune psicosi, anche se la messa a punto di composti più efficaci, e con effetti avversi considerevolmente più contenuti, l'ha resa un farmaco obsoleto, ritirato dal commercio in diversi Paesi.

Farmaci e tossine che interferiscono con le fasi tardive della neuroesocitosi

Si conoscono molte tossine in grado di interferire con la secrezione nervosa. Tra queste si ricordano le tossine botuliniche e la tossina tetanica, l' α -latrotossina e alcune tossine di serpente ad attività fosfolipasica.

I sette diversi sierotipi di tossine botuliniche (A-G) e la tossina tetanica sono prodotte dal *Clostridium botulinum* e dal *Clostridium tetani*, rispettivamente. Le tossine botuliniche e la tossina tetanica hanno azioni molto simili, e la grande diversità delle sindromi neurologiche da esse provocate, paralisi flaccida nel caso del botulismo, paralisi spastica nel caso del tetano, è dovuta al fatto che le tossine, pur bloccando entrambe l'esocitosi, agiscono a livello di sinapsi diverse. Le tossine botuliniche agiscono a livello della terminazione nervosa delle giunzioni neuromuscolari, dove bloccano il rilascio di acetilcolina e la conseguente attivazione dei muscoli scheletrici, causando paralisi flaccida. La tossina tetanica, che pure viene internalizzata a livello della giunzione neuromuscolare, è trasportata in senso retrogrado lungo i nervi motori fino a raggiungere i corpi cellulari dei motoneuroni nelle corna anteriori del midollo spinale. Qui, la tossina raggiunge per via transinaptica, forse attraverso il rilascio di esosomi, le terminazioni degli interneuroni inibitori; trasloca nel citoplasma e inibisce il rilascio di glicina con conseguente sovraeccitazione generalizzata dei motoneuroni e contrazione simultanea e incoordinata dei muscoli agonisti e antagonisti, causando paralisi spastica.

Le tossine dei clostridi sono costituite da due subunità unite da un ponte disolfuro: la subunità pesante (100 kDa) consente il legame della tossina a specifici recettori proteici/lipidici presenti sulla membrana dei neuroni bersaglio favorendo l'internalizzazione, mentre la subunità leggera (50 kDa) è una Zn proteasi che, dopo essere traslocata nel citoplasma, proteolizza le proteine SNARE bloccando l'esocitosi (Figura 32.5). La tossine botuliniche A, C ed E, proteolizzano SNAP-25, le tossine B, D, F G e la tossina tetanica tagliano VAMP-2 e il sierotipo C proteolizza anche la syntaxina 1a. Le tossine clostridiali

intossicano i neuroni attraverso un meccanismo a più stadi, che comprende il legame delle tossine alla superficie neuronale, l'internalizzazione che avviene in molti casi attraverso l'endocitosi delle vescicole sinaptiche, dissociazione della subunità pesante da quella leggera, traslocazione nel citosol della catena leggera e successiva proteolisi delle proteine SNARE. Il modello attualmente riconosciuto di legame delle tossine clostridiali ai nervi periferici prevede una doppia interazione: inizialmente la tossina si lega a gangliosidi presenti sulla membrana della terminazione, e successivamente interagisce con un recettore proteico, costituito da regioni luminali delle proteine vescicolari sinaptotagmina I/II o SV2. Sia i recettori proteici che quelli lipidici delle tossine botuliniche sono ampiamente distribuiti nel sistema nervoso sia periferico che centrale. Resta ancora da chiarire se l'azione preferenziale delle tossine botuliniche per la sinapsi colinergica sia dovuta a un arricchimento delle isoforme recettoriali specifiche e dei gangliosidi a livello delle giunzioni colinergiche.

L'identificazione delle proteine SNARE come bersagli molecolari dell'azione delle tossine clostridiali ha rivestito una grande importanza per il progresso delle nostre conoscenze dei meccanismi secretivi. Ha infatti chiarito che le proteine SNARE hanno un ruolo essenziale nel processo di esocitosi, visto che è sufficiente tagliare in un unico punto una qualsiasi delle proteine (sinaptobrevina, syntaxina o SNAP-25) per determinare un blocco irreversibile del rilascio di neurotrasmettitore. Inoltre, a partire dagli anni 80 la tossina botulinica A, e in minore misura anche la B, sono utilizzate con molto successo in tutto il mondo per il trattamento di numerosi disordini dovuti a iperattività dei nervi colinergici che innervano diversi muscoli (strabismo, blefarospasmo, piede equino, torcicollo, crampi occupazionali, acalasia esofagea) e ghiandole (iperidrosi). Vengono iniettate a livello muscolare ogni 3 o 4 mesi e, nonostante l'ampio utilizzo, non sono state riportate a oggi importanti controindicazioni a lungo termine. Negli ultimi anni è stata anche verificata la capacità di diversi sierotipi di tossine botuliniche di bloccare il rilascio di mediatori algogeni, quali CGRP e sostanza P dai neuroni sensoriali. Questi risultati aprono la possibilità di estendere l'utilizzo clinico delle tossine botuliniche al trattamento del dolore neuropatico e dell'emicrania, in pazienti non responsivi alle terapie attualmente disponibili.

L' α -latrotossina costituisce il componente tossico principale del veleno di vedova nera. È una proteina di alto peso molecolare, che agisce legandosi a specifici recettori di membrana, le latrofilline, presenti esclusivamente sulla membrana presinaptica dei neuroni. Le latrofilline costituiscono una nuova famiglia di proteine di adesione, accoppiate a proteine G. Il legame della tossina a questi recettori causa un aumento di calcio a livello presinaptico e massiccio rilascio asincrono di NT. In assenza di Ca^{2+} extracellulare, l'attivazione dell'esocitosi si accompagna al blocco dell'endocitosi, per cui dopo qualche decina di minuti dall'applicazione della tossina si assiste a un depauperamento del contenuto di vescicole sinaptiche

della terminazione, con incorporazione permanente della membrana delle stesse nella membrana plasmatica. Anche alcune tossine isolate da veleno di serpente (notexina, β -bungarotossina, taipoxina, textilotoxina) sono in grado di stimolare la neuroesocitosi fino a provocare deplezione di vescicole sinaptiche, probabilmente a causa di una concomitante inibizione dell'endocitosi. È stato dimostrato che queste tossine possiedono un'atti-

ività fosfolipidica localizzata prevalentemente a livello della superficie della terminazione nervosa, che porta a idrolisi dei fosfolipidi prevalentemente localizzati nel foglietto esterno della membrana presinaptica (Paoli M et al., 2009). La conseguente formazione di acidi grassi e lisofosfolipidi altera la curvatura e la permeabilità della membrana presinaptica, promuovendo la fusione delle vescicole sinaptiche seguita da blocco della trasmissione.

TAKE HOME MESSAGE

- Le sinapsi sono strutture fondamentali del cervello che mediano il trasferimento dell'informazione tra le cellule nervose.
- La trasmissione del segnale e l'elaborazione delle informazioni a livello delle sinapsi controllano tutte le funzioni del corpo, compresi tutti gli aspetti della conoscenza, quali l'attenzione, la percezione, l'apprendimento, il processo decisionale, così come l'umore e l'affetto.
- Le sinapsi rappresentano l'organello subcellulare più complesso del SNC. La loro funzione si basa sull'interazione tra centinaia di proteine presenti a livello pre- e postsinaptico che controlla: a) la formazione delle sinapsi; b) il traffico di proteine e organelli che servono per il rilascio controllato di neurotrasmettitori; c) la ricezione del segnale a livello postsinaptico; d) i processi di plasticità sinaptica a breve e lungo termine.
- I farmaci che sono correntemente utilizzati per il trattamento delle malattie del cervello hanno come bersaglio alcune delle principali funzioni sinaptiche, quali la ricaptazione e la degradazione del neurotrasmettitore o l'attivazione del recettore.
- Gli studi epidemiologici, genetici e funzionali nel corso dell'ultimo decennio hanno dimostrato che le sinapsi sono l'elemento centrale per l'eziologia e la progressione di una vasta gamma di disturbi neurologici e psichiatrici, compresi le malattie neurodegenerative, i disturbi psicotici (ad esempio, la schizofrenia), l'autismo, i disturbi affettivi (ad esempio, la depressione), che possono quindi essere considerati complessivamente sinaptopatie.
- Il riconoscimento del fatto che molti disturbi psichiatrici e neurologici sono sinaptopatie è stato sicuramente un importante passo avanti in psichiatria e in neurologia. Questo riconoscimento apre la prospettiva per l'identificazione di farmaci che agiscano specificamente sui componenti sinaptici che risultano alterati in tali patologie, e che agiscano quindi in modo da trattare le reali cause della patologia stessa.

Bibliografia essenziale

- ▶ Alvarez VA, Sabatini BL. 2007 Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu Rev Neurosci* 2007;30:79-97. Review.
- ▶ Araque A. Astrocytes process synaptic information. *Neuron Glia Biol* 2008;4:3-10. Epub 2009 Feb 27. Review.
- ▶ Becherer U, Rettig J. Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 2006;326:393-407. Epub 2006 Jul 4. Review.
- ▶ Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol* 2010;91:313-48. Epub 2010 May 10. Review.
- ▶ Dittman J, Ryan TA. Molecular circuitry of endocytosis at nerve terminals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009;25:133-60. Review.
- ▶ Giagtzoglou N, Ly CV, Bellen HJ. Cell adhesion, the backbone of the synapse: "Vertebrate" and "Invertebrate". *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a003079. Review.
- ▶ Gogolla N, Galimberti I, Caroni P. Structural plasticity of axon terminals in the adult. *Curr Opin Neurobiol* 2007;17:516-24. Epub 2007 Oct 22. Review.
- ▶ Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology* 2009;57:343-6. Epub 2009 Jul 3. Review.
- ▶ Matteoli M, Coco S, Schenk U, Verderio C. Vesicle turnover in developing neurons: how to build a presynaptic terminal. *Trends Cell Biol* 2004;14:133-40. Review.
- ▶ Rizo J, Rosenmund C. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:665-74. doi:10.1038/nsmb.1450.
- ▶ Schoch S, Gundelfinger ED. Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res* 2006;326:379-91. Epub 2006 Jul 25. Review.
- ▶ Ziv NE, Ahissar E. Neuroscience: New tricks and old spines. *Nature* 2009;462:859-61.

La trasmissione catecolaminergica

Sandra Sigala, Maurizio Memo, M. Cristina Missale, Pier Franco Spano

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire i principali concetti per comprendere l'organizzazione funzionale del sistema catecolaminergico, in particolare la distribuzione e le funzioni dei sistemi catecolaminergici nel sistema nervoso autonomo e nel sistema nervoso centrale
- ▶ Acquisire conoscenze sul metabolismo delle catecolamine
- ▶ Acquisire i principali concetti sui recettori catecolaminergici (struttura, distribuzione, secondi messaggeri)
- ▶ Acquisire i principali concetti sui meccanismi d'azione dei farmaci attivi sul sistema catecolaminergico e comprendere i principi di intervento farmacologico sui recettori adrenergici

Le catecolamine hanno un ruolo fondamentale nel controllo di funzioni vegetative, motorie e psichiche. Esse sono il principale neurotrasmettitore rilasciato dalle terminazioni delle fibre postgangliari del sistema simpatico periferico e dalla midollare del surrene. Nel sistema nervoso centrale (SNC), i neuroni catecolaminergici rappresentano una popolazione minoritaria delle cellule nervose, ma la loro importanza è documentata dall'utilità clinica di farmaci attivi su questo sistema nel trattamento dei disturbi della psiche (antidepressivi e antipsicotici), dagli effetti psichici di farmaci d'abuso (amfetamine) e dal ruolo che la degenerazione dei neuroni del sistema dopaminergico ha nella genesi del morbo di Parkinson.

Distribuzione e funzioni dei sistemi catecolaminergici nel sistema nervoso autonomo

Il sistema nervoso autonomo (SNA) regola il funzionamento di funzioni "viscerali" che non sono sotto il controllo volontario, come la circolazione del sangue, la respirazione, la digestione, l'equilibrio idrosalino e metabolico, la temperatura corporea. Queste funzioni sono sotto il controllo di due sistemi nervosi periferici ad attività generalmente contrapposta, l'ortosimpatico e il parasimpatico. I due sistemi modulano la funzione di cellule e organi in risposta a sollecitazioni ambientali ed emotive e generano, ai loro estremi, due quadri sintomatologici caratteristici: l'ortosimpatico è responsabile della "reazione di lotta e

fuga", mentre il parasimpatico è responsabile di una serie di risposte che possono essere identificate con l'immagine di un "soggetto dopo un lauto pasto".

La reazione di lotta e fuga è caratterizzata da una serie di risposte viscerali che mettono in condizione l'individuo di affrontare un duello fisico in cui è richiesta forza, resistenza e rapidità di reazione. Il sistema cardiovascolare è infatti intensamente stimolato (aumento della forza, della frequenza e della gittata cardiaca); allo stesso tempo, il sangue viene ridistribuito a tessuti di vitale importanza nella reazione (muscolatura scheletrica) a danno di altri organi che non sono coinvolti (apparato gastrointestinale) o che, esposti al pericolo come nel caso della cute, potrebbero essere fonte di emorragie (pallore). La muscolatura liscia della capsula splenica si contrae per aumentare il volume di sangue circolante. La dilatazione bronchiale e l'inibizione delle secrezioni bronchiali assicurano una maggiore capacità respiratoria. La forza di contrazione della muscolatura scheletrica è aumentata. L'attività del sistema gastrointestinale e delle ghiandole connesse è inibita, ma è aumentata la liberazione di acidi grassi e glucosio dai depositi, funzioni necessarie per fornire a cervello e muscoli l'energia necessaria per affrontare il pericolo.

L'attività del parasimpatico è più strettamente connessa a funzioni di tipo "digestivo". La gittata cardiaca è ridotta soprattutto per bradicardia e vi è vasodilatazione in distretti "voluminosi" come quello cutaneo e splancnico. La riduzione della pressione arteriosa e dell'apporto di sangue al cervello è responsabile della classica sonno-

lenza post-prandiale. L'aumento delle secrezioni salivari e delle ghiandole annesse all'apparato digerente risponde alle esigenze digestive come pure l'aumento della motilità intestinale. Si possono avere contrazione della muscolatura liscia bronchiale e secrezione delle vie aeree. A livello oculare si ha miosi.

Neurotrasmettitori del sistema nervoso autonomo

L'attività simpatica del sistema nervoso autonomo è sostenuta da neurotrasmettitori catecolaminergici: noradrenalina (NA), adrenalina (A) e dopamina (DA). La NA è il principale neurotrasmettitore rilasciato da terminazioni sinaptiche delle fibre nervose simpatiche. LA è la catecolamina principalmente prodotta dalla midollare del surrene e viene rilasciata direttamente nel circolo sanguigno. Poiché A e NA differiscono fra loro in termini di potenza sui vari recettori adrenergici, l'attivazione dei nervi ortosimpatici può produrre effetti diversi rispetto a quelli indotti dall'attivazione della midollare del surrene (ad esempio, nel distretto splanchnico la NA induce vasostrizione, mentre l'A produce un aumento del flusso per riduzione delle resistenze periferiche). In genere l'attivazione della midollare del surrene è indotta da stimolazioni "stressanti" di maggiore intensità. L'attività del sistema parasimpatico è mediata dal neurotrasmettitore acetilcolina (ACh) attivo su recettori periferici (vedi Capitolo 34). Una componente delle fibre che costituiscono il sistema nervoso autonomo non libera né catecolamine né acetilcolina (NANC, *Non-Adrenergic Non-Cholinergic*); si ritiene che il trasmettitore maggioritario delle fibre NANC sia l'ossido d'azoto (vedi Capitoli 39, 40 e 43). Sia i neuroni colinergici che quelli catecolaminergici sono in grado di liberare neuropeptidi, generalmente dotati di attività sinergica a quella del neurotrasmettitore.

Organizzazione anatomica del sistema simpatico

I neuroni pregangliari del sistema simpatico, che sintetizzano e liberano acetilcolina, si estendono dal primo segmento spinale toracico ai segmenti lombari più bassi e sono localizzati nella sostanza grigia intermediolaterale del midollo spinale (Figura 33.1). Gli assoni di questi neuroni emergono dal midollo spinale attraverso le radici ventrali, decorrono nei nervi spinali e proiettano, attraverso i rami comunicanti bianchi, ai gangli paravertebrali e prevertebrali dove formano sinapsi nicotiniche con i neuroni simpatici post-gangliari. Questi, che sintetizzano e liberano NA, innervano e regolano l'attività degli organi effettori. In queste sedi (ma anche nel SNC) le fibre adrenergiche hanno l'aspetto microscopico di catene di rosario in cui ciascun rigonfiamento rappresenta una zona di accumulo di vescicole sinaptiche; inoltre esse formano soprattutto contatti "en passant" caratterizzati dall'assenza di densità post-sinaptiche sulle cellule riceventi. Quindi negli organi

innervati il neurotrasmettitore diffonde rapidamente dal sito di rilascio e può così stimolare (o inibire) numerose cellule contemporaneamente, la cosiddetta "volume transmission". La stimolazione catecolaminergica è così più diffusa di quella colinergica.

Le surrenali sono ghiandole endocrine costituite da una parte esterna o corticale che produce gli ormoni steroidei e una parte interna o midollare. Le cellule della midollare del surrene (cellule cromaffini), derivano dall'ectoderma della cresta neurale e producono A e, in minor quantità, NA (rapporto A/NA = 4/1). La midollare del surrene è innervata da fibre pregangliari colinergiche, decorrenti con il nervo splanchnico, ed è quindi considerata una sorta di ganglio simpatico che secerne A nel torrente circolatorio. Un'attivazione generalizzata del sistema simpatico è accompagnata quindi da un'aumentata secrezione degli ormoni della midollare del surrene che potenziano gli effetti della NA liberata localmente.

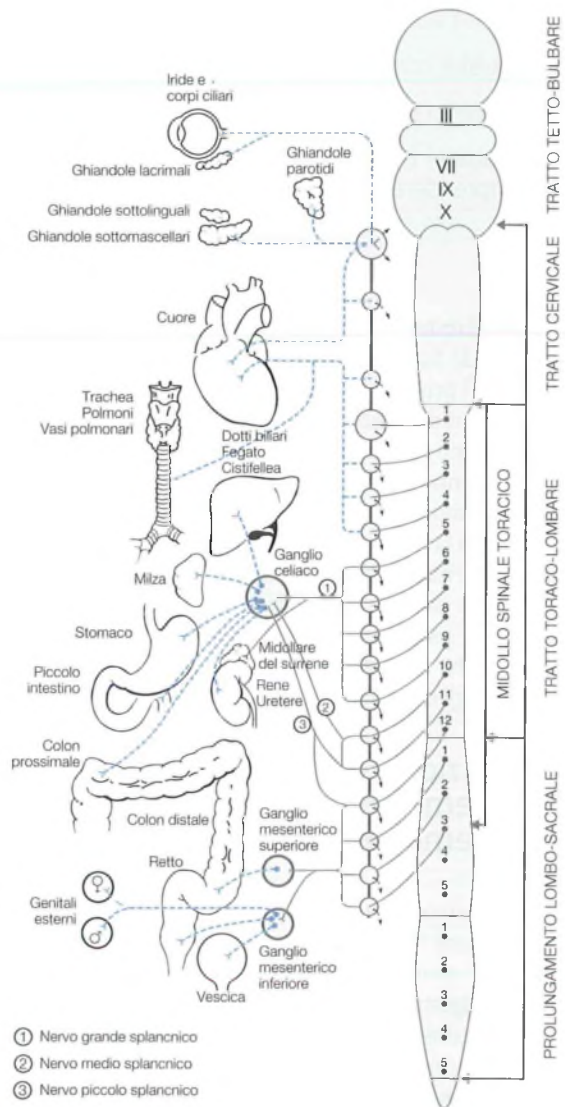


FIGURA 33.1 Basi anatomiche e distribuzione del sistema simpatico catecolaminergico. Le fibre post-gangliari simpatiche sono tratteggiate in blu.

L'ortosimpatico ha effetti cronotropi e inotropi positivi

Nel miocardio, nelle cellule dei nodi seno-atriale (SA) e atrio-ventricolare (AV) e nel tessuto di conduzione, sono espressi sia i recettori α_1 che i recettori β_2 , con una prevalenza del sottotipo β_1 . L'attivazione del recettore β_1 nei nodi SA e AV e nel tessuto di conduzione induce, rispettivamente, un aumento della frequenza cardiaca (effetto cronotropo positivo), un aumento della velocità di conduzione atrio-ventricolare (effetto dromotropo positivo) e alterazioni del ritmo (effetto batmotropo positivo). In particolare, le catecolamine accelerano la depolarizzazione lenta delle cellule del nodo SA durante la diastole (fase 4 del potenziale d'azione). Anche nelle cellule del Purkinje le catecolamine accelerano la depolarizzazione diastolica e possono indurre l'attivazione di pacemaker latenti (induzione di automatismi). Per effetto diretto sul miocardio le catecolamine aumentano la forza di contrazione (effetto inotropo positivo), la gettata cardiaca, il lavoro cardiaco e il consumo di ossigeno.

L'ortosimpatico è un regolatore positivo della pressione arteriosa

La stimolazione del simpatico, oltre ad aumentare l'attività cardiaca, provoca costrizione dei vasi di resistenza precapillari della cute, delle mucose e del rene e attiva il sistema renina-angiotensina-aldosterone, effetti che portano a un aumento della pressione arteriosa. Gli effetti sulle resistenze periferiche di un distretto vascolare dipendono dal tipo di recettore che è prevalentemente espresso: le catecolamine sono infatti attive su popolazioni recettoriali diverse e dotate di attività vasodilatatrice (recettori β_2) o vasoconstrictrice (recettori α_1 giunzionali e α_2 extragiunzionali). Poiché A e NA hanno spettri di potenza diversi sui vari recettori (NA più attiva sui recettori α che sui β), il risultato finale dell'attivazione del sistema simpatico sulle resistenze periferiche potrà variare in funzione del rapporto A/NA.

Gli effetti sulle muscolature lisce dei vari apparati sono finalizzati alle reazioni di lotta e fuga

Gli effetti delle catecolamine sulle muscolature lisce sono molteplici e dipendono dal tipo di recettore espresso nei diversi tessuti. Le catecolamine rilasciano la muscolatura gastrointestinale attraverso l'attivazione di recettori β_2 . In particolare la motilità e il tono della muscolatura dello stomaco e dell'intestino sono diminuiti dalle catecolamine, mentre la muscolatura degli sfinteri, che esprime recettori α_1 , è contratta. La NA ha anche un effetto miorelassante indiretto mediato da recettori α_{2A} localizzati nei gangli parasimpatici intramurali dello stomaco, la cui stimolazione induce una diminuzione della liberazione di acetilcolina. La stimolazione dei recettori α_{2A} produce anche inibizione della secrezione acida gastrica indotta dalla stimolazione del vago.

La muscolatura bronchiale esprime recettori β_2 ed è rilassata dalle catecolamine: l'attivazione simpatica migliora

quindi le capacità ventilatorie, effetto di fondamentale importanza nelle situazioni di lotta. Per quanto riguarda i meccanismi molecolari attraverso i quali i recettori β rilasciano la muscolatura liscia, vedi CD: Approfondimento 22.4.

A vari livelli del tratto urinario sono presenti sia sottotipi recettoriali α che β . In particolare, le catecolamine influenzano l'attività di tali recettori a livello sia centrale che periferico, con un importante effetto sull'attività urinaria. I recettori α sono il target d'azione dei farmaci α_1 -antagonisti utilizzati per i disturbi del basso apparato urinario (ad esempio, ipertrofia prostatica benigna, vedi oltre). I recettori β , in particolare i sottotipi β_2 e β_3 , sono espressi lungo tutto il tratto urinario e il legame con la NA media il rilassamento della muscolatura liscia; sembrano inoltre espressi nell'urotelio, anche se il loro significato funzionale non è ancora ben noto.

L'ortosimpatico stimola l'aumento dei livelli ematici di glucosio e di acidi grassi liberi

A livello epatico, le catecolamine interagiscono con recettori β_2 la cui stimolazione porta alla attivazione della glicogeno fosforilasi, e alla inibizione della glicogeno sintetasi (vedi Capitolo 31). L'effetto risultante è una diminuzione della sintesi del glicogeno e un aumento della produzione di glucosio, con un aumento della glicemia. A livello del tessuto adiposo, sono espressi recettori β_3 la cui stimolazione induce l'attività della trigliceride lipasi con conseguente effetto lipolitico e aumento degli acidi grassi liberi nel plasma (vedi Capitolo 30).

Il sistema dopaminergico periferico modula le risposte dell'ortosimpatico

Un dato che suggerisce l'esistenza di un sistema periferico dopaminergico è la dimostrazione della presenza di recettori specifici. Non è ancora del tutto chiaro se la DA periferica provenga da neuroni specifici o funga da cotrasmettitore nei neuroni adrenergici. È stata tuttavia dimostrata con tecniche di immunoistochimica l'esistenza di interneuroni dopaminergici a livello gangliare, sotto il controllo dei neuroni pregangliari colinergici e con terminazioni sui neuroni postgangliari noradrenergici. Gli effetti della DA a livello cardiovascolare sono soprattutto di tipo vasodilatatorio e sono sia diretti, dovuti alla presenza di recettori specifici sulla muscolatura liscia di alcuni distretti vascolari (in particolare renale e mesenterico), che indiretti, mediati da inibizione del rilascio di catecolamine. Inoltre la DA inibisce il rilascio di aldosterone indotto da angiotensina II e ha attività inibitoria sulla trasmissione gangliare. La stimolazione del sistema dopaminergico periferico comporta effetti di notevole interesse terapeutico, quali aumento della filtrazione glomerulare, del flusso ematico renale e della natriuresi. Farmaci agonisti dopaminergici possono essere molto utili nel controllo da shock cardiogeno o ipovolemico, in cui l'aumento dell'attività simpatica può compromettere la funzionalità renale.

Distribuzione e funzioni dei sistemi catecolaminergici nel SNC

A livello del SNC, NA, A e DA hanno distribuzioni peculiari e specifiche a cui sono spesso associate funzioni distinte. Così il sistema dopaminergico gioca un ruolo importante nel controllo extrapiramidale del movimento; infatti, alterazioni di alcune vie dopaminergiche sono alla base del morbo di Parkinson; i sistemi noradrenergico e dopaminergico sono coinvolti nel controllo di alcune funzioni psichiche e alterazioni della funzionalità catecolaminergica centrale rappresentano una parte importante del substrato organico delle psicosi e della depressione. Nella figura 33.2 sono schematizzate le più importanti vie noradrenergiche e dopaminergiche presenti nel SNC.

Sistemi noradrenergici

Nel SNC sono stati identificati due principali gruppi di neuroni noradrenergici i cui sistemi assonali forniscono una innervazione diffusa a numerose aree cerebrali; si tratta dei sistemi del locus coeruleus e tegmentale laterale.

La maggior parte delle vie noradrenergiche origina dal locus coeruleus e dal segmento laterale

Il locus coeruleus contiene il 43% dei neuroni noradrenergici cerebrali che proiettano in maniera diffusa a tutta la corteccia cerebrale, all'ippocampo, al talamo e all'ipotalamo nonché al midollo spinale, prevalentemente alle corna ventrali, e ai nuclei sensoriali del tronco encefalico e al cervelletto (Figura 33.2A).

Nel sistema tegmentale laterale sono stati identificati tre principali gruppi neuronali: il nucleo motorio dorsale del vago, il nucleo del tratto solitario e il nucleo tegmentale laterale. I neuroni del nucleo tegmentale laterale innervano l'ipotalamo, il bulbo olfattorio e parte dell'amigdala. Il nucleo del tratto solitario riceve afferenze dai centri più rostrali del sistema vegetativo e dai centri della formazio-

ne reticolare bulbo-pontina. Dal nucleo del tratto solitario originano le fibre discendenti che esplicano un controllo tonico e fasico sui neuroni pregangliari del midollo spinale e della catena laterale del simpatico.

Controllo centrale dell'attività del sistema nervoso vegetativo

Il sistema dei nuclei tegmentali laterali, e in particolare il nucleo del tratto solitario che riceve fibre provenienti dai baro- e chemocettori aortici e carotidei, controlla l'attività del sistema nervoso autonomo. Una riduzione della pressione arteriosa provoca una diminuzione del firing dei barocettori e quindi una "disinibizione" di questo nucleo noradrenergico. La conseguente attivazione del tono simpatico causa aumento delle resistenze vascolari periferiche e della gittata cardiaca e ripristino dei normali valori pressori. La stimolazione dei recettori α_2 postsinaptici localizzati nel nucleo del tratto solitario e nel locus coeruleus diminuisce l'attività dei neuroni noradrenergici efferenti e quindi riduce il tono simpatico periferico e la pressione arteriosa. Farmaci agonisti su questi recettori (ad esempio, la clonidina e l' α metil-DOPA) possono essere utilizzati nella terapia dell'ipertensione arteriosa.

I sistemi noradrenergici sono coinvolti nella patogenesi della depressione

Tra le ipotesi formulate sulle origini biochimiche della depressione, è stata suggerita anche l'esistenza di una regolazione anomala dei sistemi noradrenergici. Sono infatti state dimostrate alterazioni dell'attività dei recettori α_2 che controllano la secrezione della NA e un aumento del numero dei recettori β_2 -adrenergici nella corteccia frontale e nel sistema limbico. Queste alterazioni potrebbero rendere ragione della presenza di ansia, agitazione psicomotoria, insonnia, anoressia e turbe del sistema nervoso autonomo nei soggetti depressi. Il trattamento con farmaci antidepressivi provoca, a lungo termine, desensitizzazione dei recettori β_1 a livello corticale e

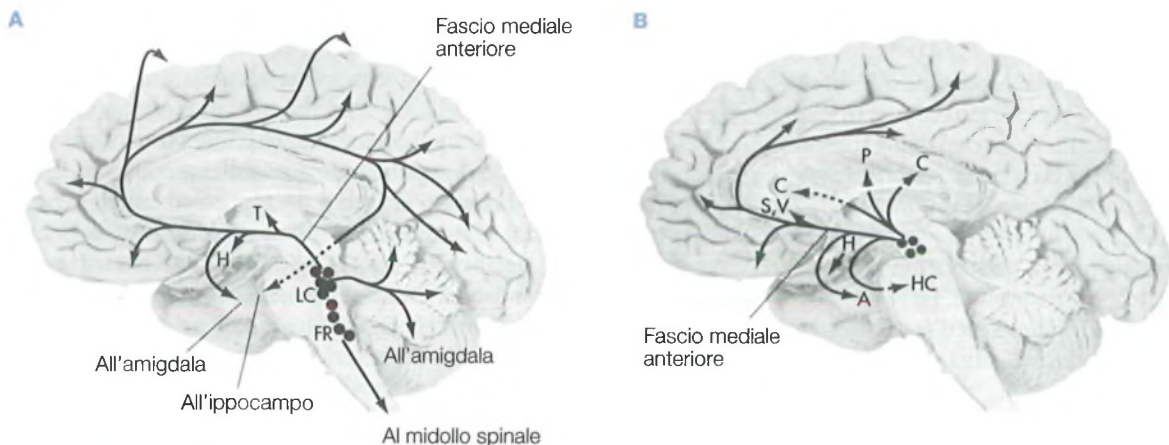


FIGURA 33.2 Sistemi catecolaminergici nel sistema nervoso centrale dell'uomo. Vie noradrenergiche del locus coeruleus e del tronco dell'encefalo (A) e vie dopaminergiche (B). A: amigdala; C: nucleo caudato; H: ipotalamo; HC: ippocampo; LC: locus coeruleus; P: putamen; S: nuclei del setto; V: striato ventrale; FR: formazione reticolare; T: talamo.

dell'ippocampo. Alcune classi di farmaci antidepressivi, agendo sui meccanismi di ricaptazione della NA, normalizzano la trasmissione noradrenergica e la responsività dei recettori β_2 .

I sistemi noradrenergici stimolano lo stato di veglia

Le funzioni sonno-veglia dipendono dall'attività dei sistemi neuronali a proiezione diffusa noradrenergici, serotoninergici, colinergici e istaminergici presenti nel tronco encefalico che partecipano in modo integrato al controllo di queste funzioni. In particolare lo stato di veglia è controllato dall'attivazione dei sistemi catecolaminergici e colinergici, mentre lo stato di "sonno lento" è controllato dal sistema serotoninergico. La rete neuronale diffusa che origina dal locus coeruleus è deputata al controllo della vigilanza e dell'attenzione; l'attività dei neuroni adrenergici di questo nucleo è aumentata nello stato di veglia ed è ridotta durante il sonno. L'effetto della NA sulle funzioni sonno-veglia è mediato da recettori α_1 . La stimolazione farmacologica dei recettori α_1 nelle aree di proiezione del locus coeruleus promuove infatti lo stato di veglia, mentre la stimolazione dei recettori α_2 localizzati sui corpi cellulari e sui dendriti dei neuroni del locus coeruleus produce uno stato di sedazione.

Regolazione complessa del comportamento alimentare

Le monoamine nel SNC sono implicate nella regolazione del comportamento alimentare, regolazione che consiste in un effetto facilitatorio mediato da recettori α_2 nella parte mediale dell'ipotalamo e in un effetto inibitorio mediato dai recettori β_2 nella parte laterale dell'ipotalamo. È importante mettere in evidenza che il nucleo perifornicale riceve anche fibre dopaminergiche la cui stimolazione provoca una sensibile riduzione del consumo di alimenti, effetto mediato dai recettori D2.

Effetti endocrini

I sistemi adrenergico e noradrenergico esercitano un duplice controllo, sia stimolatorio che inibitorio, sulla secrezione di ACTH agendo sia a livello ipotalamico che a livello dell'ipofisi. L'azione stimolatoria è mediata da recettori α_1 , mentre l'effetto inibitorio si esercita attraverso recettori di tipo β .

Il sistema noradrenergico modula la secrezione del GH interagendo con recettori di tipo α a livello ipotalamico: la stimolazione dei recettori α_1 inibisce la liberazione sia tonica che fasica del GH, mentre la stimolazione dei recettori α_{2A} la facilita. Inoltre i β recettori hanno effetto inibitorio sulla secrezione dell'GH mediato probabilmente da un aumento del tono somatostatinerico.

Il sistema noradrenergico, mediato da recettori α , facilita la secrezione del TSH, in seguito a una azione diretta a livello ipotalamico dove la NA stimola la liberazione del TRH.

Le gonadotropine FSH e LH sono sintetizzate e secrete dall'adenipofisi sotto l'influenza dell'ipotalamo attraverso l'intervento del peptide LHRH. La NA è il principale

neurotrasmettitore responsabile del rilascio pulsatile di LH, grazie ai suoi effetti stimolatori mediati da recettori α localizzati sui neuroni ipotalamici che producono LHRH.

Sistemi dopaminergici

I primi concetti sull'unicità di un ruolo fisiologico della DA, indipendentemente dalla sua funzione di precursore della NA e dell'A, furono formulati alla fine degli anni 50. Furono presto identificati nel SNC neuroni specifici contenenti come neurotrasmettitore primario la DA nel sistema extrapiramidale, limbico e ipotalamo-ipofisario. La DA è gerarchicamente assai importante nel SNC, nella modulazione non solo dell'attività psichica e motoria, ma anche del tono dell'umore, della secrezione di alcuni ormoni ipofisari e, molto probabilmente, di alcune componenti dei processi cognitivi (vedi CD: Approfondimento 7.1). I principali sistemi dopaminergici del SNC sono:

- il sistema nigrostriatale, che origina dalla substantia nigra (SN) (A9) e proietta a diverse aree del nucleo striato;
- il sistema mesolimbico, che origina dalla zona A10 dell'area ventrale tegmentale (VTA) e nella parte mediale della SN, innerva il nucleo accumbens, il tubercolo olfattorio e il nucleo interstiziale della stria terminalis (sistema mesolimbico), e il sistema mesolimbocorticale le cui fibre dalla zona A10 innervano il setto, l'ippocampo, l'amigdala e diverse aree corticali;
- il sistema dopaminergico mesotalamico, che origina dai neuroni A10 e proietta a strutture del ponte, del diencefalo e del telencefalo;
- i sistemi dopaminergici tuberoinfundibolare e tubero ipofisario, che originano dai corpi cellulari dopaminergici dei nuclei arcuato e periarquato dell'ipotalamo, detti A12. Il sistema tuberoipofisario origina nella parte anteriore dell'area A12 e innerva la parte intermedia e posteriore dell'ipofisi (Figura 33.2B).

La degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrostriatali causa il morbo di Parkinson

Il sistema dopaminergico nigrostriatale fa parte del sistema extrapiramidale ed è preposto al controllo del tono muscolare e alla coordinazione motoria. La DA che viene liberata a livello striatale può interagire con specifici recettori localizzati nelle terminazioni dopaminergiche (autorecettori), nelle terminazioni dei neuroni glutamatergici corticali, nei neuroni postsinaptici intrastriatali colinergici e nei neuroni GABAergici che proiettano al globus pallido e/o alla SN, pars reticulata. Essendo la DA un neurotrasmettitore inibitorio, le sue azioni nel nucleo striato si manifestano in una riduzione della liberazione di DA (autoregolazione presinaptica), di acido glutammico, di acetilcolina e di GABA, quest'ultimo a livello pallido-nigrale. Il costante tono dopaminergico inibitorio si può ridurre in almeno due condizioni: a) degenerazione dei neuroni dopaminergici della SN nel morbo di Parkinson; b) trattamento cronico con antagonisti recettoriali (neurolettici). In entrambe le situazioni si provocano delle manifestazioni simili, caratterizzate da fine tremore a riposo, acinesia e rigidità.

Queste conoscenze costituiscono il fondamento razionale per lo sviluppo di una terapia farmacologica delle patologie del sistema extrapiramidale (vedi CD: Approfondimento 33.1. *Dopamina e morbo di Parkinson* e Approfondimento 39.1).

DA e disturbi del comportamento: alterazioni dopaminergiche e schizofrenia

L'importanza dei sistemi dopaminergici centrali nei disturbi del comportamento è dimostrata dal fatto che la potenza clinica dei farmaci antipsicotici tipici (neurolettici) utilizzati nella terapia della schizofrenia è linearmente correlata alla capacità di bloccare i recettori dopaminergici, specialmente del sottotipo D2. L'ipotesi che un'alterazione della trasmissione dopaminergica fosse responsabile della patogenesi della schizofrenia è stata suggerita dal fatto che un importante e frequente effetto collaterale dei farmaci antipsicotici è l'induzione di una sintomatologia simile a quella propria del morbo di Parkinson (parkinsonismo iatrogeno). L'ipotesi è ulteriormente avvalorata dall'osservazione che farmaci che causano un aumento dei livelli di DA (ad esempio: L-DOPA, cocaina, amfetamine) provocano una psicosi simile alla forma paranoide della schizofrenia. Dati ottenuti in vivo mediante la tecnica della PET (*Positron Emission Tomography*) da pazienti schizofrenici non ancora esposti a trattamento farmacologico hanno dimostrato un considerevole aumento dei recettori D2 a livello dei nuclei caudato e accumbens e nel tubercolo olfattorio. I vari sistemi dopaminergici descritti in precedenza sembrano coinvolti in funzioni psichiche in parte distinte e peculiari. Il sistema mesolimbico sembra coinvolto nei processi di memoria e in quelli emotivi: modificazioni della percezione e delle capacità intellettuali compaiono in alcuni tipi di epilessia psicomotoria e sono molto simili a quelle che si osservano nei pazienti schizofrenici. Lesioni a carico della VTA provocano demenza e l'insorgenza di episodi psicotici. Il sistema dopaminergico mesocorticale proietta alla corteccia prefrontale, che è coinvolta in importanti funzioni psichiche superiori, quali l'attenzione, la motivazione, la pianificazione, l'organizzazione temporale del comportamento e la socializzazione. Si ritiene che l'attivazione di questo sistema giochi un ruolo importante nei fenomeni di dipendenza da farmaci e sostanze d'abuso, quali eroina, cocaina, nicotina e alcol. È importante ricordare che i pazienti affetti da morbo di Parkinson, in cui vi è una riduzione generalizzata dei neuroni dopaminergici, accanto alla sintomatologia motoria extrapiramidale mostrano anche ridotte capacità affettive e di motivazione e scarsa spontaneità.

L'insieme dei dati anatomici, funzionali, patologici e farmacologici ottenuti dai pazienti psicotici fa pensare che nei pazienti schizofrenici coesistano due diverse alterazioni dei sistemi dopaminergici. La prima, dovuta a un aumento dell'attività del sistema mesolimbico e probabilmente mediata da recettori D2, D3 e D4, è responsabile dei sintomi "positivi" della schizofrenia e risponde discretamente al trattamento con gli antipsicotici tipici;

la seconda, caratterizzata da una riduzione dell'attività dopaminergica nell'area prefrontale, è responsabile dei sintomi negativi, non risponde altrettanto bene ai farmaci antipsicotici tipici, mentre la terapia con i farmaci antipsicotici cosiddetti "atipici" sembra avere un effetto migliore. L'ipotesi unificante che è stata proposta suggerisce che il difetto primario della schizofrenia sia una riduzione dell'attività delle proiezioni dopaminergiche mesocorticali alla corteccia prefrontale; quest'ultima eserciterebbe in condizioni normali un effetto inibitorio a feed-back sul sistema mesolimbico. Venendo a mancare l'inibizione prefrontale, si genererebbe l'iperattività dopaminergica della via mesolimbica, tipica della schizofrenia. È importante però tener presente che l'ipotesi dopaminergica, benché attraente, rimane pur sempre una delle molte ipotesi di lavoro e offre anche il fianco a numerose critiche. Tra queste va ricordato che diversi farmaci antipsicotici mancano di selettività e sono attivi anche sui recettori 5-HT₂ per la serotonina (5-HT), che spesso la sintomatologia recede dopo diversi giorni o settimane di trattamento e non subito come sarebbe da aspettarsi per un semplice blocco recettoriale. È quindi probabile che queste disfunzioni siano da attribuirsi ad alterazioni di complessi circuiti regolatori che coinvolgono anche altri sistemi neurotrasmettitoriali.

Le vie dopaminergiche del "piacere"

Le vie dopaminergiche che vanno dall'area ventrotemporale al nucleus accumbens e alla corteccia prefrontale sono il substrato anatomico funzionale più rilevante coinvolto nella percezione del piacere, nella gratificazione da sostanze chimiche (sostanze d'abuso), da comportamenti diversi quali il sesso, il gioco d'azzardo, l'alimentazione, il godimento estetico di opere d'arte. Molti altri neurotrasmettitori sono coinvolti in questi aspetti, ma quasi tutti attraverso la regolazione della secrezione di DA da parte delle vie dopaminergiche sopra menzionate. Molti farmaci che interferiscono con questo sistema dopaminergico hanno un ruolo assai importante nella patologia e nella terapia di questa funzione di fondamentale importanza per la vita e la relazione tra individui (vedi CD: Approfondimento 33.2. *Sistema cerebrale della gratificazione* e Capitolo 7).

DA e controllo del vomito

Recettori dopaminergici sono presenti nella zona chemorecettore di innesco del vomito (CTZ), situata nell'area postrema nel pavimento del IV ventricolo del midollo allungato; nella CTZ sono presenti anche recettori colinergici e istaminergici. Mentre l'attivazione dei recettori dopaminergici (prevalentemente D2) induce il vomito, antagonisti dei recettori dopaminergici, muscarinici e H1 istaminici e agonisti dei recettori serotoninergici 5-HT₃ sono dotati di attività antiemetica. È da notare che recettori dopaminergici sono anche situati a livello della parete gastrica dove sembrano mediare l'inibizione della motilità gastrica che si ha in corso di nausea e vomito. Farmaci ad attività antidopaminergica possono quindi rappresentare un utile strumento farmacologico

per il controllo del vomito (ad esempio, metoclopramide); tuttavia la pericolosità degli effetti derivati dall'uso cronico (parkinsonismo) e l'entità della sedazione fanno spesso preferire gli antistaminici. È importante ricordare che la CTZ è situata in una zona del SNC in cui l'efficienza della barriera ematoencefalica è particolarmente ridotta. La somministrazione di farmaci dotati di scarsa liposolubilità (e quindi relativamente incapaci di superare la barriera ematoencefalica) come il domperidone (antagonista D2) riduce l'entità degli effetti centrali e ne permette l'uso, ad esempio, nel controllo del vomito indotto da farmaci dopaminergici nel corso della terapia del morbo di Parkinson.

■ DA e sistemi ipotalamici

Sono stati identificati neuroni e recettori dopaminergici in nuclei specifici dell'ipotalamo. In particolare, l'attivazione di recettori dopaminergici di tipo D2 nel nucleo perifornicale produce una diminuzione del consumo di cibo e l'assunzione di farmaci antipsicotici ad attività antidopaminergica induce un aumento ponderale. Anche la temperatura corporea è in parte regolata dalla DA. La stimolazione dei recettori D2 ipotalamici induce ipotermia nell'animale da esperimento, mentre in alcuni pazienti psichiatrici in terapia con antipsicotici si può manifestare una alterazione dei sistemi termoregolatori con marcata ipertermia ("sindrome maligna da neurolettici").

■ DA e sistemi endocrini

La DA è il principale fattore inibitorio della secrezione di prolattina dall'ipofisi. I neuroni che mediano questo effetto originano nel nucleo arcuato dell'ipotalamo e fanno parte del sistema tuberoinfundibolare. I recettori ipofisari attraverso cui la DA esercita il suo effetto inibitorio sul rilascio di prolattina sono del sottotipo D2; il blocco da parte dei neurolettici provoca una marcata iperprolattinemia con insorgenza di amenorrea e galattorrea nella donna e impotenza e ginecomastia nell'uomo. L'inibizione della secrezione di prolattina indotta farmacologicamente dalla somministrazione di farmaci agonisti D2 (bromocriptina, lisuride, pergolide, cabergolina) trova applicazione nella terapia dei prolattinomi. La DA interviene anche nella regolazione pulsatile dell'ormone somatotropo e nel controllo inibitorio della secrezione di MSH (ormone melanocita stimolante).

Sintesi delle catecolamine

■ La sintesi inizia dall'amminoacido tirosina

Il punto di partenza per la sintesi delle catecolamine è rappresentato dagli amminoacidi essenziali fenilalanina e tirosina, che derivano dalle proteine presenti nella dieta (Figura 33.3).

L'assunzione di tirosina con la dieta è sufficiente per la sintesi delle catecolamine, tuttavia la fenilalanina può essere trasformata in tirosina per mezzo dell'enzima fenilalanina idrossilasi. Questo enzima è assente in una malattia congenita, la fenilchetonuria.

La tirosina idrossilasi è l'enzima che catalizza l'idrossilazione in posizione 3 dell'anello fenolico della tirosina, con formazione di diidrossifenilalanina (DOPA). La velocità della reazione, peraltro piuttosto lenta, è il fattore limitante la sintesi delle catecolamine ed è sotto stretto controllo dell'attività del neurone. Infatti la velocità di sintesi aumenta in condizioni di elevata attività neuronale (neural firing), un effetto che è principalmente dovuto ad aumento del numero di molecole di enzima presenti nel neurone. Al contrario, un aumento della concentrazione intracellulare dei prodotti finali della sintesi delle catecolamine ha effetti inibitori sull'attività enzimatica. La tirosina idrossilasi è associata al reticolo endoplasmatico dei nervi catecolaminergici e richiede tetraidropteridina e ioni Fe²⁺ per la sua attivazione. La DOPA non si accumula nei nervi catecolaminergici poiché si forma lentamente e viene rapidamente convertita in DA, a opera della DOPA decarbossilasi. Questo enzima, che per la scarsa specificità di substrati viene anche detto "decarbossilasi degli amminoacidi aromatici", richiede il piridossal fosfato come coenzima e ha una localizzazione diffusa (è presente anche a livello renale ed epatico). L'enzima agisce soltanto sugli isomeri levogiri. La trasformazione di DOPA in DA è inibita in maniera competitiva da una serie di farmaci quali metildopa, carbidopa e benserazide;

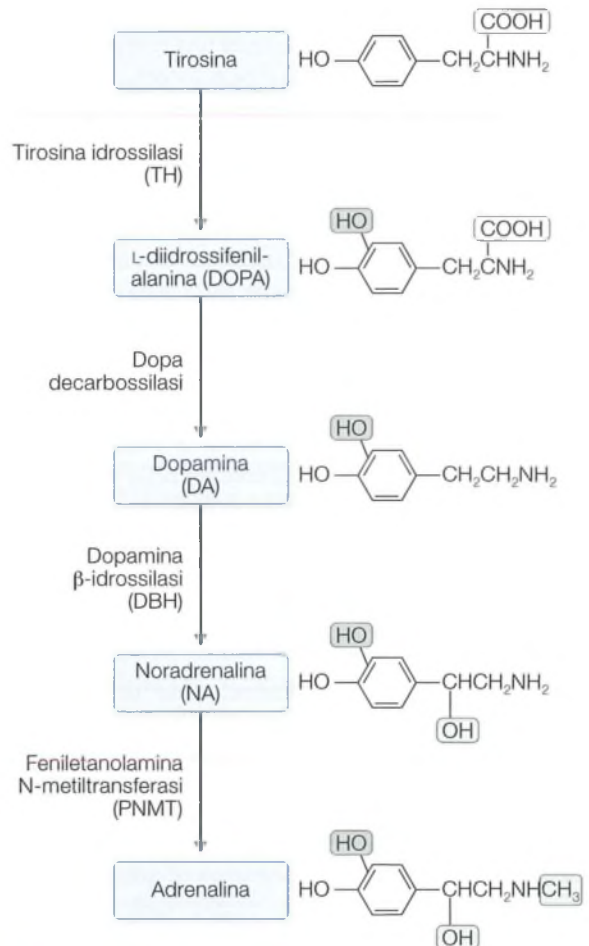


FIGURA 33.3 Tappe della sintesi delle catecolamine.

gli ultimi due, per la loro caratteristica di non essere in grado di superare la barriera ematoencefalica, vengono utilizzati, in associazione con L-DOPA, nella terapia del morbo di Parkinson. In questo modo viene inibita a livello periferico la trasformazione della L-DOPA in DA e vengono così ridotti i possibili effetti collaterali che possono insorgere per stimolazione dei recettori dopaminergici periferici (vomito, ipotensione).

Le cellule cromaffini del surrene e i neuroni adrenergici e noradrenergici sono caratterizzati dalla capacità di esprimere un enzima, la DA β -idrossilasi, che converte la DA in NA. L'enzima contiene rame come gruppo prostetico e richiede acido ascorbico come cofattore. Nelle cellule cromaffini e nei neuroni adrenergici, la NA viene metilata ad A a opera dell'enzima feniletanolamina N-metiltransferasi.

Immagazzinamento vescicolare e rilascio di catecolamine

Nella terminazione nervosa, le catecolamine sono presenti in forma libera nel citoplasma o racchiuse in vescicole sinaptiche dove possono essere libere o legate a complessi macromolecolari. La captazione della NA attraverso la membrana della vescicola coinvolge un meccanismo di trasporto che utilizza, come fonte di energia, il gradiente di pH vescicola/citoplasma creato da una pompa protonica vescicolare che consuma ATP (vedi anche Capitolo 24). Le vescicole sinaptiche dei terminali catecolaminergici e i granuli delle cellule cromaffini contengono inoltre ATP (nella proporzione di circa una molecola per ogni quattro molecole di catecolamina) e hanno un alto contenuto di proteine acide, idrosolubili chiamate cromogranine. L'enzima DA β -idrossilasi è anch'esso contenuto nelle vescicole sinaptiche; si ritiene che parte della sua attività nella via biosintetica delle catecolamine si svolga a livello vescicolare. Le cromogranine insieme all'ATP e agli ioni bivalenti (Ca^{2+} e Mg^{2+}) formano il complesso macromolecolare che lega le catecolamine (o altre ammine) all'interno delle vescicole. In questo modo la concentrazione di neurotrasmettitore libero all'interno della vescicola è molto ridotta, a tutto vantaggio dell'efficienza del trasportatore vescicolare, e la pressione osmotica all'interno della vescicola è controllata.

Simpaticomimetici indiretti

Numerosi derivati feniletilaminici sono in grado di competere con le catecolamine per il trasporto nelle vescicole e per il legame alle cromogranine e quindi spostano l'equilibrio tra la forma libera e quella legata del neurotrasmettitore verso la forma libera intravescicolare; questa a sua volta si riequilibra rapidamente con la forma libera citoplasmatica. In conseguenza di questa serie di spiazzamenti, la forma libera citoplasmatica aumenta drasticamente e le catecolamine vengono rilasciate con meccanismo non vescicolare dal terminale nervoso. Il rilascio non vescicolare è, almeno in parte, mediato dal

trasportatore di membrana: questo è normalmente deputato al recupero delle catecolamine liberate ma, in queste condizioni, è forzato a lavorare in direzione opposta e le riversa nello spazio extracellulare (vedi anche Capitolo 24). Farmaci dotati di queste capacità "spiazzanti" sono detti simpaticomimetici indiretti in quanto i loro effetti simpaticomimetici non sono dovuti ad attivazione recettoriale, ma sono mediati dal neurotrasmettitore rilasciato dal terminale nervoso. Alcune sostanze d'abuso, come l'amfetamina, agiscono in quanto dotati di attività simpaticomimetica indiretta (Tabella 33.1 e vedi CD: Approfondimento 24.4).

Spegnimento del segnale catecolaminergico

Analogamente ad altri sistemi neurotrasmettitoriali, le catecolamine vengono liberate in maniera massiva nello spazio sinaptico in seguito a depolarizzazione della membrana presinaptica e agiscono a livello recettoriale. Queste azioni sono di durata limitata. Le catecolamine liberate nello spazio sinaptico vengono infatti rapidamente eliminate attraverso due principali meccanismi: catabolismo e ricaptazione (vedi anche Capitolo 32).

Le monoamino ossidasi e le catecol-O-metiltransferasi sono i principali sistemi enzimatici responsabili del catabolismo delle catecolamine

Le principali vie di degradazione delle catecolamine sono rappresentate dalla deaminazione ossidativa, operata dalle monoamino ossidasi (MAO), e dalla O-metilazione, a opera delle catecol-O-metiltransferasi (COMT) (Figura 33.4). I composti 3-metossilici formati dalle catecolamine a opera della COMT sono substrati per le MAO, e i catecoli con catene laterali alcoliche o acide, formati dalle catecolamine per azione delle MAO, sono substrati per le COMT. Per i substrati circolanti nel sangue, entrambe le vie normalmente giungono a completamento. Nell'uomo, durante le 24 ore di escrezione urinaria, vengono

TABELLA 33.1 Simpaticomimetici indiretti

Farmaco	Meccanismo d'azione	Indicazioni d'uso
Efedrina	Misto	Decongestionante della mucosa nasale
Pseudoefedrina	Misto	Decongestionante della mucosa nasale
Fenilpropanolamina	Misto	Decongestionante della mucosa nasale
Amfetamina	Indiretto	—
Metamfetamina	Indiretto	—
Metilfenidato	Indiretto	Disturbi da deficit dell'attenzione e iperattività (ADHD)
Pemolina	Indiretto	Disturbi da deficit dell'attenzione e iperattività (ADHD)

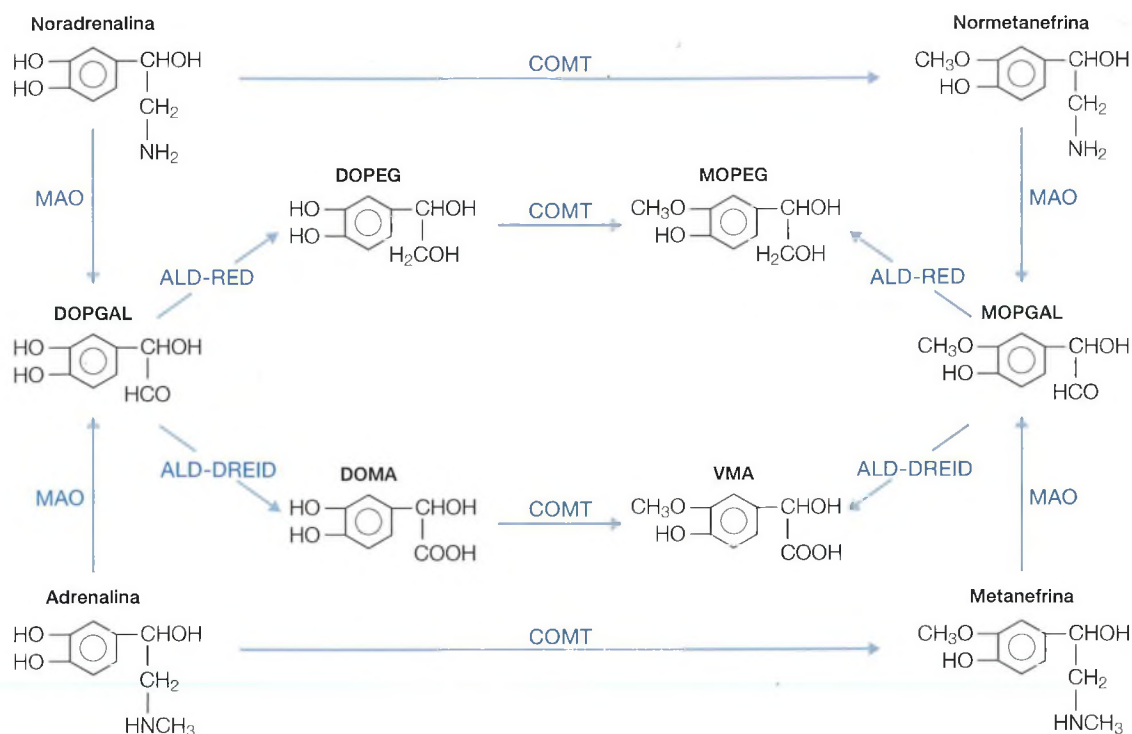


FIGURA 33.4 Catabolismo di adrenalina e noradrenalina. Sono riportati in colore gli acronimi degli enzimi coinvolti. Entrambi i neurotrasmettitori sono deaminati e ossidati dalle monoamino ossidasi (MAO) a formare il composto 3,4-diidrossifenilglicolaldeide (DOPGAL), che viene successivamente ridotto o deidrogenato da aldeidi reductasi o deidrogenasi (ALD-RED, ALD-DEIDR). I prodotti che così si formano (DOPEG: 3,4-diidrossifeniletilenglicole; DOMA: acido 3,4-diidrossimandelico) vengono metabolizzati da catecol-O-metiltransferasi (COMT) e formano i due principali metaboliti escreti con le urine: MOPEG (3-metossi-4-idrossifeniletilenglicole) e VMA (acido 3,metossi-4, idrossimandelico). Una via alternativa del catabolismo dei due neurotrasmettitori prevede un'iniziale metilazione da parte delle COMT, seguita da deaminazione ossidativa da parte delle MAO. Il prodotto intermedio comune MOPGAL (3,metossi-4, idrossifenilglicolaldeide) è ridotto o deidrogenato in MOPEG o VMA.

normalmente eliminati i seguenti metaboliti delle catecolamine endogene: da 2 a 4 mg di acido metossi-idrossimandelico, 0,1 mg di normetanefrina, 0,1-0,2 mg di metanefrina. Sono normalmente escreti circa 2-5 μ g di A non metabolizzata. I livelli plasmatici di catecolamine e dei relativi metaboliti possono aumentare sino a più di cento volte in presenza di degenerazione neoplastica delle cellule cromaffini (feocromocitoma). La liberazione spontanea di catecolamine dai feocromocitomi si manifesta frequentemente dal punto di vista clinico in un rialzo pressorio anche di entità notevole e spesso non rispondente alla terapia farmacologica. La diagnosi differenziale rispetto ad altre forme di ipertensione può essere fatta mediante determinazione plasmatica delle catecolamine (o dei loro metaboliti).

Le MAO neuronali sono localizzate prevalentemente sulla membrana esterna dei mitocondri presenti nella terminazione catecolaminergica (vedi anche Capitolo 29). Il prodotto della deaminazione ossidativa è differente a seconda del substrato enzimatico: nel caso della NA si forma la 3,4-diidrossifenilglicolaldeide e nel caso della DA, l'acido 3-4 diidrossifenil acetico. Esistono almeno due sottotipi di MAO neuronali: MAO-A e MAO-B prodotti da due geni diversi. Le MAO-B sono prevalentemente neuronali mentre le MAO-A sono ubiquitarie. Le MAO-A sono specializzate nel deaminare la catena

laterale etil-aminica di derivati indolici e sono presenti nelle terminazioni nervose dei neuroni adrenergici e serotoninergici sia centrali che periferici. Le MAO-B sono invece specializzate nel deaminare i nuclei fenil-etilaminici. Ottimi substrati della MAO-B sono la DA, la bifenetanolamina e la tiramina. Un farmaco inibitore irreversibile delle MAO, l'iproniazide, è stato il primo farmaco a essere utilizzato per il trattamento della depressione. Tuttavia, i farmaci inibitori irreversibili delle MAO (fenelzina e tranilcipromina) aumentano la disponibilità della tiramina, contenuta in molti cibi (vini, formaggi, salumi), provocando crisi ipertensive anche gravi. Successivamente, sono stati poi sviluppati farmaci con prevalente e reversibile inibizione delle MAO-B (selegilina), che inducono aumento della disponibilità sinaptica della DA. Il farmaco può essere utilizzato da solo o in associazione con la L-DOPA nella terapia del morbo di Parkinson. A causa della specificità d'azione nei confronti della MAO-B, la selegilina ha scarsa attività antidepressiva e non potenzia gli effetti cardiovascolari indotti dall'assunzione di tiramina. Le COMT sono localizzate preferenzialmente in sede postsinaptica, in gran parte nel citoplasma e in minor misura nella membrana plasmatica. Funge da donatore di gruppi metilici la S-adenosil metionina. Questi enzimi sono ubiquitari nell'organismo, sono dotati di selettività per il gruppo

catecolo e sono attivati da Mg^{2+} e altri cationi bivalenti. Sono in corso di sviluppo farmaci (tolcalpone ed entacapone) in grado di bloccare l'attività delle COMT, con l'intento di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche della L-DOPA nel trattamento del morbo di Parkinson.

La maggior parte delle catecolamine secrete è ricatturata dal terminale sinaptico

I meccanismi di ricaptazione sono in grado di riportare all'interno della cellula circa l'80% della quantità di neurotrasmettitore liberato nello spazio sinaptico in seguito a depolarizzazione. Il processo di ricaptazione è un meccanismo attivo, saturabile, Na^+ -dipendente e dovuto a specifici trasportatori di membrana localizzati a livello presinaptico (vedi Capitoli 24 e 32).

I trasportatori per le catecolamine non sono selettivi, trasportano anche la 5-HT ma differiscono per l'affinità di legame con il substrato da trasportare; si possono così distinguere un trasportatore per A/NA, un trasportatore per 5-HT e uno per DA. La selettività d'azione è imposta dalla loro espressione che è tipicamente cellula-specifica: i neuroni noradrenergici, sia centrali che periferici, esprimono selettivamente il trasportatore per la NA, quelli dopaminergici il trasportatore per la DA e quelli serotoninergici il trasportatore per la 5-HT.

Cocaina e antidepressivi triciclici modulano l'attività dei trasportatori per le catecolamine

Numerosi farmaci sono capaci di inibire la ricaptazione di catecolamine a livello sinaptico. L'azione di questi farmaci si manifesta in un potenziamento e prolungamento degli effetti delle catecolamine, a livello sia centrale che periferico. Tra questi farmaci vanno ricordati alcune classi di antidepressivi triciclici, la cocaina e la fenossibenzamina.

Il meccanismo d'azione degli antidepressivi triciclici è rappresentato dal blocco dei sistemi di captazione delle monoamine. Gli antidepressivi triciclici si possono ulteriormente suddividere in due categorie in funzione della maggiore attività sui sistemi di ricaptazione della 5-HT (amitriptilina) o della NA (imipramina). Sono stati successivamente sviluppati farmaci antidepressivi inibitori selettivi della ricaptazione della 5-HT (fluoxetina), della NA (reboxetina) o misti (duloxetina, venlafaxina). Gli antidepressivi "atipici" sono invece un folto gruppo di farmaci con strutture chimiche e meccanismi d'azione differenti. Rientrano in questa classe di farmaci bupropione, trazodone, mirtazapina e atomoxetina.

Indipendentemente dal loro meccanismo d'azione primario, tutti i farmaci antidepressivi, dopo il trattamento continuato per almeno 2 settimane, producono una diminuzione della densità dei recettori β -adrenergici corticali. L'effetto tardivo indotto dagli antidepressivi si correla bene all'osservazione clinica della necessità di un periodo di trattamento di almeno 2 settimane perché compaiano gli effetti terapeutici degli antidepressivi.

L'azione antidepressiva dei derivati triciclici può essere ricondotta al blocco della ricaptazione delle monoamine;

è però importante ricordare che questi farmaci hanno anche un discreto grado di attività anticolinergica e antistaminica, dovuto al blocco dei recettori muscarinici e istaminergici H_1 , che limita i dosaggi e la scelta dei pazienti da trattare. Questi effetti non sono presenti negli antidepressivi di più recente sintesi, quali fluoxetina, reboxetina e venlafaxina (vedi CD: Approfondimento 24.3). La cocaina rientra nella classe farmacologica degli psicostimolanti. L'assunzione di cocaina produce uno stato di euforia non distinguibile da quello prodotto dall'amfetamina, diminuisce l'appetito e il desiderio di dormire. L'effetto è breve, di circa 1 ora. La cocaina è un farmaco d'abuso che genera dipendenza. L'effetto psicostimolante della cocaina viene attribuito alla sua capacità di aumentare le concentrazioni sinaptiche di DA attraverso l'inibizione del processo di ricaptazione nei neuroni dopaminergici del sistema mesolimbocorticale. La cocaina produce anche effetti a livello cardiovascolare, vasocostrizione coronarica e sensitizzazione del miocardio, dovuti al blocco della ricaptazione di NA a livello periferico e che sono i principali fattori responsabili della ischemia, sia cerebrale che cardiaca, e delle aritmie facilmente riscontrabili in soggetti che fanno uso di cocaina. Gli effetti centrali psicostimolanti vanno incontro a tolleranza più rapidamente di quelli periferici sul sistema cardiovascolare ed è per questo che è facile riscontrare danni al sistema cardiocircolatorio in persone che abusano di cocaina. È importante ricordare che la cocaina possiede anche una forte azione anestetica locale che probabilmente contribuisce in modo significativo all'insorgenza dei suoi effetti sia a livello periferico che centrale.

Recettori per le catecolamine

Tutti i recettori del sistema catecolaminergico appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G e sono quindi costituiti da una singola catena polipeptidica che attraversa 7 volte la membrana plasmatica. Essi sono distinti in recettori adrenergici (per A e NA) e recettori dopaminergici. Sulla base della sensibilità a farmaci diversi, delle omologie di sequenza e dei meccanismi di trasduzione attivati, sia i recettori adrenergici che quelli dopaminergici sono ulteriormente suddivisi in famiglie che comprendono diversi membri.

Recettori adrenergici

Il concetto dell'esistenza di diverse popolazioni di recettori adrenergici fu sviluppato da Ahlquist nel 1948, studiando l'ordine di potenza di alcune ammine simpaticomimetiche in vari sistemi effettori. Egli osservò che la NA era molto potente nel provocare la contrazione delle muscolature lisce e molto debole nel determinarne il rilassamento. Al contrario l'isoproterenolo provocava solo rilassamento e l'A era in grado di produrre sia contrazione che rilassamento con la stessa potenza. Ahlquist propose quindi l'esistenza di due tipi di recettori adrenergici, chiamati α e β .

TABELLA 33.2 Classificazione dei recettori adrenergici

Famiglia	Sottotipi	Meccanismi di trasduzione
α_1	α_{1A}	\uparrow IP3/DAG
	α_{1B}	\uparrow IP3/DAG
	α_{1D}	\uparrow IP3/DAG
α_2	α_{2A}	\downarrow cAMP \downarrow permeabilità al K^+ \downarrow permeabilità al Ca^{2+}
	α_{2B}	\downarrow cAMP \downarrow permeabilità al Ca^{2+}
	α_{2C}	\downarrow cAMP
β	β_1	\uparrow cAMP
	β_2	\uparrow cAMP
	β_3	\uparrow cAMP

Il successivo sviluppo delle tecniche di legame e di biologia molecolare ha dimostrato l'esistenza di almeno 9 recettori adrenergici, per cui il paradigma originariamente proposto da Ahlquist è stato riconsiderato ed è stata proposta l'esistenza non di due soli recettori ma di due famiglie recettoriali, identificate come α e β (Tabella 33.2).

Recettori α -adrenergici

Verso la metà degli anni 70 diverse osservazioni sperimentali rivelarono l'esistenza di vari sottotipi dei recettori α . Furono definiti α_1 i recettori sensibili alla fenossibenzamina (antagonista), presenti nella muscolatura liscia vascolare dove mediano la vasocostrizione e α_2 i recettori non sensibili alla fenossibenzamina e sensibili alla clonidina (agonista), localizzati sulle terminazioni noradrenergiche, dove esercitano un controllo inibitorio sulla liberazione di NA e nei gangli parasimpatici intramurali dello stomaco, dove inibiscono la liberazione

di acetilcolina. Studi successivi rivelarono che in realtà i recettori α_2 non sono solo presinaptici, ma sono presenti anche a livello della muscolatura liscia vascolare e che la vasocostrizione indotta dalle catecolamine è mediata da una popolazione mista di recettori α_1 e α_2 post-giunzionali.

I recettori α_1 attivano la fosfolipasi C

I risultati degli studi di biologia molecolare hanno rivelato un'ulteriore eterogeneità nell'ambito dei recettori α_1 e α_2 . Sono stati infatti clonati tre recettori di tipo α_1 , identificati come α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , e tre recettori di tipo α_2 , chiamati α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} (Tabella 33.2). L'analisi delle sequenze dei sottotipi recettoriali α indica che essi condividono la struttura a 7 territori transmembrana, caratteristica dei recettori legati alle proteine G.

Studi funzionali hanno dimostrato che i tre recettori $\alpha_{1A, B, D}$ stimolano preferenzialmente la proteina $G_{q/11}$, con attivazione della cascata di idrolisi del fosfatidil inositolo a opera della fosfolipasi C. La loro stimolazione attiva quindi la produzione di inositolo trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG) dai fosfolipidi di membrana con conseguente aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} e attivazione della proteinchinasi C (Figura 33.5).

I recettori α_1 mediano la gran parte degli effetti contratturanti esercitati dall'ortosimpatico sulla muscolatura liscia e sono localizzati prevalentemente a livello dei vasi, della muscolatura liscia gastrointestinale e del tratto genitourinario e nel cuore (Tabella 33.3). A livello centrale i recettori α_1 , sia α_{1A} che α_{1B} , sono presenti nelle aree innervate dai sistemi noradrenergici come la corteccia, l'ippocampo e l'ipotalamo.

I recettori α_2 inibiscono l'adenilato ciclasi

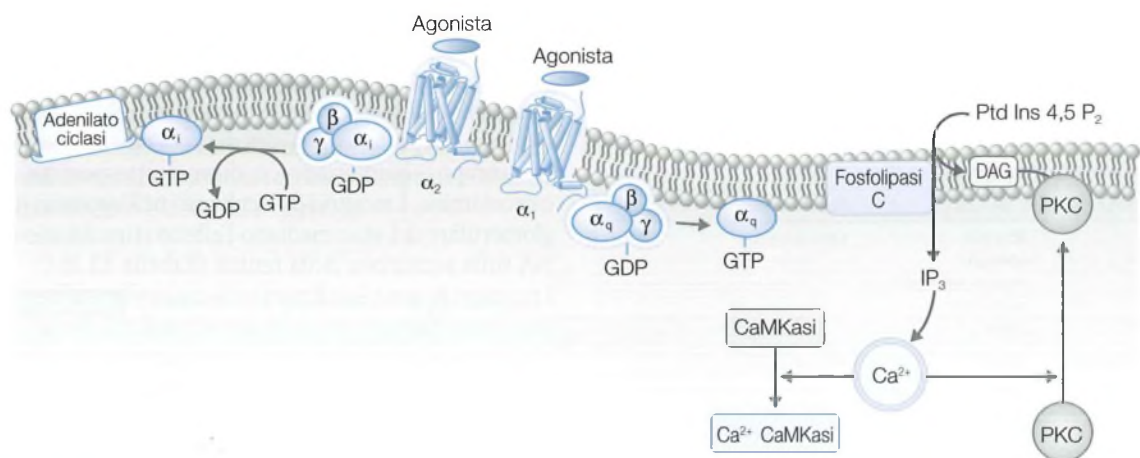


FIGURA 33.5 Meccanismi di trasduzione attivati dai recettori α . La stimolazione dei recettori α_1 da parte delle catecolamine attiva la fosfolipasi C che idrolizza il fosfatidil inositolo 4,5 bisfosfato (Ptd Ins) in inositolo trifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG). L'IP₃ interagisce con recettori specifici intracellulari e stimola la liberazione del Ca^{2+} dai depositi intracellulari. Il Ca^{2+} attiva proteinchinasi Ca^{2+} /calmodulina dipendenti e facilita la translocazione della proteinchinasi C dal citoplasma alla membrana cellulare rendendola disponibile alla attivazione da parte del DAG. La stimolazione dei recettori α_2 , che interagiscono con una proteina G inibitoria, G_i , diminuisce invece l'attività della adenilato ciclasi, con conseguente diminuzione dei livelli intracellulari di cAMP. I recettori α_{2A} possono inoltre modulare l'attività di canali ionici promuovendo la fuoriuscita di K^+ e inibendo l'influsso del Ca^{2+} . I recettori α_{2B} inibiscono in modo diretto l'attività di canali per il Ca^{2+} operati dal voltaggio.

TABELLA 33.3 Distribuzione e funzione dei recettori adrenergici

Recettori α_1		Funzione
Occhio	Muscolo radiale dell'iride	Contrazione
Muscolatura liscia vasale	Arteriole e vene	Contrazione
Muscolatura liscia degli organi	Stomaco	Rilassamento
	Intestino (pareti)	Contrazione
	Sfinteri	Contrazione
	Tratto genitourinario	Rilassamento
Fegato		Glicogenolisi
SNC		Stato di veglia Secrezione di ACTH, LH
Cuore		Aumento della contrattilità Aritmie
Recettori α_2		Funzione
Terminazioni noradrenergiche	(recettori presinaptici)	Inibizione del rilascio di NA
Stomaco	Gangli intramurali	Inibizione liberazione ACh e rilassamento
Muscolatura liscia vasale	Arteriole	Contrazione
Rene	Tubuli prossimali	Diminuzione dell'escrezione di NA
Pancreas	Isole di Langerhans	Diminuzione della secrezione di insulina
Piastrine		Aggregazione
SNC		Sedazione Aumento dell'assunzione di cibo Diminuzione del tono simpatico
Recettori β_1		Funzione
Cuore	Nodo SA	Aumento della frequenza
	Atrio	Aumento della contrattilità
	Nodo AV	Aumento della velocità di conduzione Aumento dell'automatismo
	His-Purkinje	Aumento della velocità di conduzione Aumento dell'automatismo
	Ventricolo	Aumento della contrattilità Aumento della velocità di conduzione Aumento dell'automatismo
Rene	Apparato juxtaglomerulare	Aumento della secrezione di renina
Recettori β_2		Funzione
Vasi	Arteriole: coronarie muscoli scheletrici polmonari renali	Vasodilatazione
Muscolatura liscia	Bronchi	Rilassamento
	Stomaco	
	Intestino	
	Tratto genitourinario	
	Utero	
Fegato		Glicogenolisi
SNC		Inibizione dell'assunzione di cibo
Recettori β_3		Funzione
Tessuto adiposo		Lipolisi
Muscolatura liscia	Tratto gastrointestinale	Rilassamento
	Tratto genitourinario	Rilassamento del detrusore

I recettori α_2 mediano molti degli effetti metabolici periferici del sistema simpatico, facilitano l'aggregazione piastrinica e partecipano alla risposta vasocostrittrice indotta dall'A. I recettori α_2 giocano un importante ruolo nel controllo della pressione arteriosa sia inibendo il rilascio di catecolamine dalle terminazioni sinaptiche dell'ortosimpatico (autorecettori presinaptici inibitori) che controllando (in senso inibitorio) l'attività dei centri vasomotori centrali (Tabella 33.3).

I recettori α_{2A} interagiscono con una proteina G_i e inibiscono la formazione di cAMP (Figura 33.5 e Tabella 33.2). Essi possono inoltre modulare l'attività di canali ionici promuovendo la fuoriuscita di K^+ e inibendo l'influsso del Ca^{2+} . I recettori α_{2B} inibiscono in modo diretto l'attività di canali per il Ca^{2+} operati dal voltaggio. Questo effetto sembra essere responsabile della inibizione mediata dai recettori α_2 della liberazione sia di acetilcolina a livello dei gangli parasimpatici intramurali dello stomaco che di NA dalle terminazioni simpatiche.

Il recettore α_{2A} è espresso a livello centrale nel tronco encefalico, nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo, nel cervelletto, nell'ipofisi e nel midollo spinale. A livello periferico esso è presente nel rene, nella muscolatura scheletrica, nella muscolatura bronchiale e nei vasi. Il recettore α_{2B} è stato identificato solo nelle aree cerebrali del diencefalo e manca nei tessuti periferici. Il recettore α_{2C} è stato trovato, a livello periferico, solo nel fegato e nel rene e, a livello centrale, nei gangli della base e nel cervelletto.

Recettori β -adrenergici

I recettori β -adrenergici attivano l'adenilato ciclasi

Sono stati identificati tre recettori β , chiamati β_1 , β_2 , β_3 . Tutti e tre i recettori β si accoppiano con una proteina G_s e attivano la adenilato ciclasi e la formazione di cAMP (Tabella 33.2 e Figura 33.6).

I recettori β_1 sono localizzati nel cuore, nell'apparato juxtaglomerulare del rene e nel SNC. La NA e l'A sono pressoché equipotenti nello stimolare questo recettore. Nel cuore i recettori β_1 mediano l'effetto inotropo-, cronotropo-, batmotropo- e dromotropo-positivi delle catecolamine. I recettori β_1 localizzati nell'apparato juxtaglomerulare del rene mediano l'effetto stimolatorio della NA sulla secrezione della renina (Tabella 33.3).

I recettori β_2 sono localizzati nelle muscolature lisce dove inducono rilassamento (vedi CD: Approfondimento 22.4), nella muscolatura scheletrica dove aumentano la forza di contrazione, nel fegato e nel SNC (Tabella 33.3).

Il recettore β_3 è localizzato nel tessuto adiposo, dove è coinvolto nella regolazione della termogenesi e della lipolisi, e sulla muscolatura liscia gastrointestinale e genitourinaria (Tabella 33.3). Farmaci agonisti selettivi β_3 hanno dimostrato un buon effetto antiobesità e antidiabete negli animali da esperimento ma non nell'uomo. Sono invece in fase avanzata di sviluppo farmaci agonisti β_3 per il trattamento della vescica iperattiva (mirabegron) e per il trattamento del colon irritabile (solabegron). Recentemente sono state identificate varianti

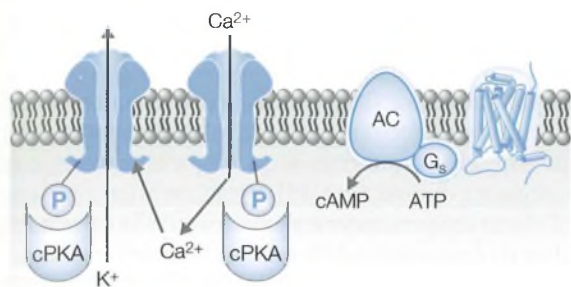


FIGURA 33.6 Ruolo del recettore β_1 -adrenergico nella modulazione della funzione cardiaca. L'attivazione dei recettori β_1 presenti sulle cellule miocardiche porta a un aumento della formazione di cAMP; la subunità catalitica della proteinkinasi A (cPKA) fosforila canali al calcio e canali al potassio voltaggio-dipendenti con conseguente aumento dell'influsso di Ca^{2+} e attivazione di correnti *rectifier* (*delayed rectifier*, vedi anche Capitolo 22). Non è ancora chiaro se gli effetti sui canali al calcio possano essere mediati da interazione diretta proteina G/canale. L'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ che ne consegue è responsabile dell'effetto inotropo positivo delle catecolamine; l'attivazione di correnti di K^+ *outward rectifiers* accelera la ripolarizzazione della cellula miocardica; è probabile che il calcio abbia un effetto modulatore positivo su queste correnti.

polimorfiche del recettore β_3 , in particolare una mutazione, che porta alla sostituzione del Trp in posizione 64 con Arg, che diminuisce l'efficienza trasduzionale del recettore β_3 con conseguente minore attivazione della lipoproteina lipasi e quindi della lipolisi. Benché questa variante recettoriale sia presente in tutta la popolazione, la sua probabilità di espressione è molto più alta negli individui obesi ed è stata associata con l'insorgenza precoce di diabete insulino-resistente.

Recettori dopaminergici

I recettori dopaminergici sono stati per lungo tempo classificati in due classi dette D1 e D2. I recettori D1 sono stati definiti come i recettori sensibili alla DA, apomorfina e altri agonisti dopaminergici ma non alla bromocriptina, e bloccati dai neurolettici. I recettori D2 sono selettivamente stimolati da bromocriptina e lisuride e selettivamente bloccati da sulpiride.

L'avvento delle nuove tecnologie di DNA ricombinante ha consentito di riconoscere all'interno delle due classi l'esistenza di diversi sottotipi recettoriali dopaminergici. Appartengono alla famiglia D1 i recettori D1 e D5 e alla famiglia D2 i recettori D2, D3 e D4 (Tabella 33.4); la sequenza del cDNA per il recettore D2 suggerisce l'esistenza di due isoforme di questo recettore che originano per splicing alternativo e che sono dette D2_s e D2_l (short e long). Le due famiglie D1 e D2 si differenziano anche nel sistema di trasduzione del segnale utilizzato. I recettori D1 stimolano la formazione di cAMP e aumentano l'attività della fosfolipasi C mentre i recettori D2 inibiscono l'adenilato ciclasi, attivano l'efflusso di K^+ e inibiscono l'influsso di Ca^{2+} (vedi CD: Approfondimento 33.3. *Le proprietà funzionali dei recettori dopaminergici sono modulate dall'interazione con altre proteine*).

Infine, i recettori D1 e D2 sono distribuiti in maniera diversa nei neuroni cerebrali e nelle cellule endocrine. Ad esempio, i neuroni che originano dalla SN (pars compacta) e che proiettano al caudato putamen esprimono recettori D2 e non D1. Nelle cellule lattotrope sono esclusivamente presenti recettori D2 mentre nelle cellule delle paratiroidi sono presenti solo recettori D1.

L'identificazione di diverse popolazioni di recettori dopaminergici ha avuto importanti implicazioni in campo fisiopatologico e farmacologico. Studi in vitro e in vivo nell'uomo hanno dimostrato che, nelle due patologie in cui il sistema dopaminergico è significativamente implicato, il morbo di Parkinson e la schizofrenia, i recettori dopaminergici sono soggetti a profonde modificazioni funzionali. Più in particolare, gli studi post mortem nei cervelli di pazienti schizofrenici hanno rivelato che sia i recettori D1 che i D2 diventano supersensitivi. È ancora dibattuto se la supersensibilità recettoriale sia dovuta al trattamento con farmaci neurolettici o sia parte integrante della eziopatologia della malattia. In ogni caso viene riproposto con sempre più convincimento il ruolo importante dei sistemi (e dei recettori) dopaminergici nelle psicosi maggiori.

I due recettori appartenenti alla famiglia D1, i recettori dopaminergici D1 e D5, presentano caratteristiche farmacologiche sovrapponibili (Tabella 33.4). Il sottotipo D1 è quello maggiormente espresso e maggiormente diffuso.

TABELLA 33.4 Classificazione dei recettori dopaminergici

Famiglia	Sottotipi	Meccanismi di trasduzione	Agonisti selettivi	Antagonisti selettivi
D1	D1	↑ cAMP ↑ PLC	Fenoldopam	SCH-23390
	D5	↑ cAMP ↑ PLC	Lo spettro farmacologico dei D5 è simile a quello dei D1	Lo spettro farmacologico dei D5 è simile a quello dei D1
D2	D2*	↓ cAMP ↓ permeabilità al K^+ ↓ permeabilità al Ca^{2+}	Bromocriptina	Sulpiride
	D3	?	Quinpirolo	
	D4	↓ cAMP		Clozapina

*Il gene dei recettori D2 codifica due diversi RNA messaggero che differiscono per la presenza (*long*, D2_l) o l'assenza (*short*, D2_s) di una sequenza di 39 amminoacidi localizzata nella terza regione intracellulare. Le due proteine che ne derivano presentano uno spettro di sensibilità farmacologica sovrapponibile

Il sottotipo D5 è prevalentemente espresso nell'ippocampo e nel nucleo parafascicolare del talamo.

I recettori della famiglia dei D2, i recettori D2_s, D2_l, D3 e D4, presentano caratteristiche farmacologiche simili ma non identiche. I recettori D3 presentano una affinità elevata, maggiore di quella dei D2 o D4, per il quinpirolo e per la DA, mentre i recettori D4, a differenza degli altri membri della famiglia, sono estremamente sensibili alla clozapina (Tabella 33.4). I quattro sottotipi recettoriali differiscono per la localizzazione e l'intensità di espressione. I più diffusi e maggiormente espressi sono i recettori D2, presenti in tutte le aree a innervazione dopaminergica, dove rappresentano l'85-95% dei recettori della famiglia D2.

Il significato della presenza delle due isoforme D2_l e D2_s del recettore D2 non è stato ancora chiarito; in particolare, presentano la stessa localizzazione, sebbene il rapporto D2_l/D2_s tra i due vari significativamente da 20:1 nell'ipofisi, 8:1 nello striato e 1:1 nella corteccia. I recettori D3 sono localizzati prevalentemente nelle aree limbiche, quali il tubercolo olfattorio, l'ippocampo e nella pars compacta della sostanza nera. I recettori D4 sono presenti nella corteccia, ippocampo e ipotalamo. È interessante notare che le cellule dell'atrio hanno un contenuto di RNA messaggero per i recettori D4 circa 20 volte maggiore di quello presente nel cervello.

Principi di intervento farmacologico sui recettori adrenergici

Farmaci attivi sui recettori α -adrenergici

Agonisti dei recettori α_1

I farmaci simpaticomimetici rappresentano un gruppo di composti che, per la loro proprietà di attivare in modo relativamente selettivo i recettori α_1 nella muscolatura liscia vascolare, inducono vasocostrizione con conseguente aumento delle resistenze vascolari periferiche e innalzamento della pressione arteriosa (Tabella 33.5). Quest'ultimo effetto è associato a bradicardia sinusale causata da attivazione di riflessi vagali ed è bloccato da atropina (un antagonista dei recettori colinergici muscarinici; vedi Capitolo 34). L'utilità clinica di questi farmaci è limitata al trattamento di alcuni pazienti con ipotensione o shock. Vengono inoltre utilizzati come vasocostrittori e decongestionanti per uso topico, a livello della mucosa nasale o nell'occhio. Possono essere associati agli anestetici locali per aumentare la durata d'azione dell'anestesia, riducendo la velocità di diffusione dell'anestetico locale nella circolazione sistemica.

Agonisti dei recettori α_2

I farmaci agonisti selettivi dei recettori α_2 (Tabella 33.5) trovano un impiego nella terapia dell'ipertensione arteriosa. In seguito allo sviluppo di altri farmaci con maggiore efficacia ma, soprattutto, gravati da minori effetti collaterali, gli agonisti α_2 non sono più considerati di prima scelta nel trattamento antipertensivo, anche se offrono

ancora un valido aiuto terapeutico in caso di forme ipertensive particolarmente resistenti alla terapia. La loro efficacia è dovuta alla interazione con i recettori α_2 localizzati nel tronco dell'encefalo (nucleo del tratto solitario). L'attivazione di questi recettori provoca diminuzione del tono simpatico e aumento di quello parasimpatico, con conseguente diminuzione della pressione arteriosa. Parte dell'effetto antipertensivo è anche dovuto alla capacità di inibire il rilascio di NA dalle terminazioni dell'ortosimpatico (recettori α_2 presinaptici inibitori). Somministrati per via endovenosa, possono provocare inizialmente aumenti transitori della pressione, secondari alla attivazione dei recettori α_2 presenti nelle arteriole.

L'attivazione dei recettori α_2 centrali è anche responsabile delle proprietà sedative della clonidina e di altri α_2 -agonisti selettivi ad azione centrale come azeperolo e dexmedetomidina, che possono venire utilizzati nella preanestesia e nella neuroleptoanestesia. Questi farmaci riducono notevolmente le dosi di anestetici o di oppiacei necessari per indurre anestesia.

Antagonisti dei recettori α

I farmaci α antagonisti si dividono in selettivi e non selettivi, in base alla capacità di discriminare tra recettori α_1 e α_2 (Tabella 33.5). Alcuni, come la prazosina e derivati, sono più potenti sui recettori α_1 che sugli α_2 ; altri, come la yohimbina, hanno uno spettro di potenza inverso. I non-selettivi sono attivi su entrambi i sottotipi recettoriali. Inoltre, l'antagonista non selettivo fenossibenzamina lega i recettori α in modo irreversibile.

Gli antagonisti selettivi del recettore α_1 provocano rilassamento degli sfinteri della vescica e vasodilatazione. Per questi effetti sono impiegati per facilitare la minzione nella ipertrofia prostatica e negli episodi acuti di ipertensione.

La yohimbina, l'unico antagonista relativamente selettivo per i recettori α_2 , ha effetti opposti a quelli della clonidina ed è stato a lungo utilizzato nel trattamento dell'impotenza maschile. La yohimbina e altri antagonisti α come gli alcaloidi dell'ergot, l'indoramina, la chetanserina e diversi neurolettici inibiscono anche altri recettori non adrenergici.

Farmaci attivi sui recettori β -adrenergici

Agonisti dei recettori β_2

I farmaci β_2 agonisti trovano un impiego terapeutico importante nel trattamento della broncocostrizione nei pazienti con asma o broncopneumopatie croniche ostruttive (BPCO) e nel trattamento del parto pretermine. Pur trattandosi di situazioni completamente diverse, il razionale farmacologico dell'uso di β_2 agonisti è l'effetto miorilassante di questi recettori sulla muscolatura liscia. L'A è più attiva sui recettori β della NA, dalla quale differisce unitamente per la presenza di un metile sul gruppo amminico della β -fentiletilamina; l'aumento delle dimensioni dei sostituenti alchilici in questa posizione aumenta l'attività β agonista. L'isoproterenolo, il primo farmaco sviluppato negli anni 40 dotato di selettività per

TABELLA 33.5 Farmaci attivi sui recettori adrenergici

Recettori α	Indicazioni cliniche	Recettori β	Indicazioni cliniche
Farmaci α agonisti		Farmaci β agonisti	
A prevalente attività α_1		β_1 selettivi	
Adrenalina*	Arresto cardiaco, shock, reazioni allergiche	Dobutamina	Shock
Efedrina*	Congestione nasale	Dopamina	Shock
Etilefrina	Ipotensione ortostatica	Isoprenalina	Shock - Aritmie (torsione di punta; asistolia; BAV completo)
Fenilefrina	Congestione nasale e oculare	β_2 selettivi	
Fenilpropanolamina	Congestione nasale	Clenbuterolo	BPCO
Midodrina	Ipotensione ortostatica	Fenoterolo	BPCO
Nafazolina	Congestione nasale e oculare	Formoterolo	BPCO
Noradrenalina*	Arresto cardiaco, shock	Indacaterolo	BPCO
Oximetazolina	Congestione nasale e oculare	Ritodrina	Parto prematuro
Pseudoefedrina	Congestione nasale	Salbutamolo	BPCO, parto prematuro
Tetrisolina	Congestione oculare	Salmeterolo	BPCO
Tramazolina	Congestione nasale	Terbutalina	BPCO, parto prematuro
Xilometazolina	Congestione nasale	Farmaci β bloccanti	
Dipivefrina*	Glaucoma	β_1 selettivi	
α_2 selettivi		Acebutololo	Iperensione arteriosa, angina, aritmie
Clonidina	Iperensione arteriosa	Atenololo	Iperensione arteriosa, angina, aritmie, infarto miocardico
Metildopa	Iperensione arteriosa	Betaxololo	Glaucoma
Brimonidina	Glaucoma	Bisoprololo	Iperensione arteriosa, angina, scompenso cardiaco congestizio
Apraclonidina (non in commercio in Italia)	Glaucoma	Celiprololo*	Iperensione arteriosa
Guanfacina (non in commercio in Italia)	Iperensione arteriosa	Esmololo	Aritmie sopraventricolari
Guanabenz (non in commercio in Italia)	Iperensione arteriosa	Metoprololo	Iperensione arteriosa, angina, aritmie, profilassi dell'emicrania
Farmaci α antagonisti		Nebivololo	Iperensione arteriosa, scompenso cardiaco congestizio
Non selettivi (non in commercio in Italia)		Non selettivi	
Fenossibenzamina	Feocromocitoma	Carteololo*	Glaucoma
Feniletanolamina	Feocromocitoma	Carvedilolo**	Iperensione arteriosa, angina, scompenso cardiaco congestizio
Tolazolina	Feocromocitoma	Labetalolo**	Iperensione arteriosa, crisi ipertensive
α_1 selettivi		Levobunololo	Glaucoma
Alfuzosina	Iperetropia prostatica benigna	Metipranololo	Glaucoma
Doxazosina	Iperensione arteriosa, ipertrofia prostatica benigna	Oxprenololo	Iperensione arteriosa
Tamsulosina	Iperetropia prostatica benigna	Pindololo	Iperensione arteriosa, angina
Terazosina	Iperensione arteriosa, ipertrofia prostatica benigna	Propranololo	Iperensione arteriosa, angina, aritmie, infarto miocardico, ipertensione portale, tireotossicosi, profilassi dell'emicrania, sintomi di ansia
Urapidil	Urgenze ed emergenze ipertensive	Sotalolo	Aritmie
α_2 selettivi (non in commercio in Italia)		Timololo	Glaucoma, ipertensione arteriosa, angina, infarto miocardico, profilassi dell'emicrania
Yoimbina	Disfunzione erettile		

*anche β_2 agonista; **anche α_1 antagonista

i recettori β , possiede un gruppo $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ in questa posizione; questo farmaco, che può essere utilizzato come stimolante cardiaco in situazioni di emergenza come l'arresto cardiaco, non discrimina però tra recettori β_1 e recettori β_2 . Successivamente sono stati sviluppati farmaci dotati di maggiore selettività per i recettori β_2 , che si sono di-

mostrati di grande utilità nel controllo sintomatologico dell'asma e di altre BPCO (Tabella 33.5). È importante considerare che l'attivazione dei recettori β_1 ha effetti stimolatori cardiaci e sulla pressione arteriosa (sia per aumentata gettata cardiaca che per rilascio di renina), mentre l'attivazione dei recettori β_2 ha effetti più variabili e diversi. L'attivazione dei recettori β_2 comporta infatti

vasodilatazione periferica, con conseguenti fenomeni riflessi di adattamento che possono portare all'insorgenza di tachicardia riflessa.

La stimolazione dei recettori β_2 presenti sulle fibre muscolari striate può provocare tremori. A seguito di somministrazione per via sistemica di alte dosi di farmaci β_2 -agonisti si può osservare un aumento della concentrazione plasmatica di glucosio, acido lattico e acidi grassi liberi e riduzione della concentrazione plasmatica di K^+ . L'insorgenza di tali effetti collaterali ha portato all'individuazione di strategie operative che consentissero di ottenere una stimolazione duratura dei recettori β_2 bronchiali con minimi effetti sui recettori degli altri tessuti. Oltre a ricercare molecole dotate di maggiore selettività per i recettori β_2 , la ricerca farmacochimica ha cercato di produrre molecole più resistenti alla degradazione enzimatica e assorbibili per via orale. I vantaggi prevedibili con tali molecole sono i seguenti: a) la maggiore resistenza agli enzimi degradativi consente o di distanziare le somministrazioni o di ridurre la dose somministrata ogni volta; b) per via orale si ottengono picchi di concentrazione plasmatica del farmaco molto più bassi rispetto a quelli indotti da pari dose somministrata per via endovenosa (vedi oltre); c) sono stati sviluppati metodi e strumenti che consentono, nel trattamento dell'asma bronchiale e della BPCO, una somministrazione controllata di questi farmaci per via inalatoria, attraverso la quale si possono ottenere concentrazioni efficaci a livello bronchiale, in assenza di effetti sistemici rilevanti. L'insieme di queste proprietà rendono attualmente l'uso dei farmaci β_2 agonisti più efficace e accompagnato da effetti collaterali meno frequenti e di minore entità.

Antagonisti dei recettori β

L'identificazione dei recettori β , la determinazione della loro distribuzione nel sistema cardiovascolare e delle loro funzioni hanno portato allo sviluppo di una classe di farmaci, i β -bloccanti, che hanno un'enorme importanza nel trattamento di numerose patologie cardiovascolari, quali ipertensione, aritmie, ischemia miocardica e scompenso cardiaco. Si tratta di una famiglia di antagonisti competitivi dei recettori β , il cui prototipo è il propranololo (molecola sviluppata negli anni 60), definito β bloccante non selettivo perché è in grado di legarsi sia ai recettori β_1 che ai recettori β_2 .

I farmaci sviluppati successivamente si distinguono per alcune caratteristiche: a) la capacità di discriminare tra i sottotipi recettoriali, come nel caso del metoprololo, dell'atenololo e del più recente nebivololo, che sono selettivi per i recettori β_1 ; b) un certo grado di attività simpatico-mimetica intrinseca (agiscono come agonisti parziali), come nel caso del pindololo e dell'acebutololo; c) proprietà vasodilatante associata, ad esempio celiprololo e carvedilolo (Tabella 33.5).

Gli effetti terapeutici più importanti dei β -bloccanti, come pure il corollario degli effetti indesiderati, possono essere ricavati dall'analisi della tabella 33.3, dove sono riportati gli effetti mediati dai recettori β in vari organi e sistemi. Non vi è dubbio che gli effetti

terapeuticamente più importanti dei β -bloccanti siano quelli cardiovascolari.

Interagendo con i recettori β_1 cardiaci, i β -bloccanti ne impediscono l'interazione con le catecolamine, con conseguente diminuzione della forza di contrazione, della gittata e della frequenza cardiaca, presentando quindi un effetto inotropo, cronotropo, batmotropo e dromotropo negativo. Questi effetti sono particolarmente evidenti quando il sistema simpatico è attivato, come durante l'esercizio fisico o in condizioni di stress.

Le indicazioni terapeutiche dei β -bloccanti comprendono numerose patologie cardiovascolari, come accennato sopra. Gli effetti cardiaci rendono i β -bloccanti particolarmente utili nella terapia dell'angina, situazione in cui vi è discrepanza tra richiesta e apporto di ossigeno al cuore. La somministrazione di un β -bloccante provoca una riduzione della richiesta di ossigeno da parte del cuore per cui si ha un miglioramento della tolleranza all'esercizio fisico.

I β -bloccanti hanno effetti importanti sul ritmo e sull'automatismo cardiaci. Essi riducono la frequenza del nodo del seno, diminuiscono la velocità di depolarizzazione di pacemaker ectopici, rallentano la conduzione atriale e la conduzione del nodo atrio-ventricolare e aumentano il periodo refrattario del nodo AV, facendone una classe essenziale di farmaci antiaritmici, utilizzati soprattutto nella terapia delle aritmie sopraventricolari.

La diminuzione della gittata cardiaca e della frequenza, ma soprattutto la diminuzione della produzione di renina, con riduzione dell'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone rendono conto dell'indicazione all'uso di questi farmaci nella terapia dell'ipertensione, sia soli che in associazione ad altri farmaci ipotensivanti. Un'ultima importante osservazione è il vantaggio terapeutico osservato somministrando dosi basse di β -bloccanti nel trattamento dello scompenso cardiaco congestizio in fase iniziale. L'assunzione dei β -bloccanti in questi pazienti permette di interrompere il circolo vizioso di attivazione simpatica riflessa, che il sistema cardiovascolare mette in atto per tentare di sopperire alla ridotta gittata cardiaca alla base della fisiopatologia dello scompenso. I β -bloccanti, riducendo l'attivazione simpatica riflessa, oltre a ridurre la tachicardia e la vasoconstrizione, riducono anche l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone, deleterio per un cuore scompensato. Il limite di questa terapia è, ovviamente, l'effetto inotropo negativo ed è per questo motivo che la terapia può essere effettuata solo in pazienti con una gittata cardiaca non completamente compromessa e la dose del farmaco deve essere bassa e "titolata" per ogni paziente.

Accanto agli effetti terapeutici, i β -bloccanti hanno effetti collaterali legati al loro meccanismo d'azione che ne limitano l'impiego in alcune situazioni cliniche. È utile ricordare che i β -bloccanti non selettivi interagendo con i recettori β_2 vasali provocano vasoconstrizione, che può essere importante in pazienti con arteriopatie obliteranti; per interazione con i recettori β_2 nella muscolatura bronchiale provocano broncoconstrizione nei pazienti con

asma bronchiale o BPCO; per interazione con i recettori β_2 epatici provocano diminuzione della produzione di glucosio, potenziando così l'ipoglicemia da insulina nel diabetico.

Farmaci attivi sui recettori dopaminergici

Da quanto descritto nei precedenti paragrafi appare chiaro che i farmaci attivi sui recettori dopaminergici rappresentano importanti classi di farmaci per il trattamento farmacologico del morbo di Parkinson e delle psicosi. Più di recente, la stimolazione dopaminergica è entrata a far parte delle strategie terapeutiche dello scompenso cardiaco acuto. L'influenza della DA sulla emesi e sulla secrezione di ormoni ha aperto la via a trattamenti sintomatici del vomito e di disfunzioni ormonali soprattutto a carico del sistema della prolattina.

La DA è utilizzata nello shock cardiogeno

Lo shock è una sindrome clinica caratterizzata da un'insufficiente perfusione tissutale associata a ipotensione. Cause dello shock possono essere, tra le altre, l'ipovolemia secondaria a disidratazione o a emorragia e l'insufficienza cardiaca secondaria a infarto del miocardio. La caduta della pressione arteriosa che si verifica nello shock induce generalmente una marcata attivazione del simpatico che, a sua volta, produce vasocostrizione periferica e aumento della frequenza e della forza di contrazione cardiaca. Se negli stadi iniziali dello shock questi meccanismi possono contribuire a mantenere la pressione arteriosa e il flusso cerebrale, essi diminuiscono però il flusso renale con conseguente riduzione della produzione di urina e sviluppo di acidosi metabolica.

Basse dosi di DA attivano principalmente i recettori D_1 presenti nei vasi renali, splanchnici e coronarici. L'aumento dell'attività dell'adenilato ciclasi provoca dilatazione delle arterie renali con conseguente aumento del flusso renale, della velocità di filtrazione glomerulare e della escrezione di Na^+ . Questi effetti esclusivamente renali sono particolarmente utili nello shock cardiogeno e in quello ipovolemico. Dosi più alte attivano anche i recettori β_1 cardiaci causando tachicardia in parte per attivazione diretta dei recettori cardiaci e in parte per stimolazione del rilascio di neurotrasmettitori dalle terminazioni catecolaminergiche (recettori presinaptici stimolatori). A concentrazioni elevate la DA attiva anche i recettori α_1 e produce vasocostrizione generalizzata.

Gli agonisti dopaminergici sono utili nel trattamento del morbo di Parkinson

Oltre alla L-DOPA, somministrata con lo scopo di aumentare il contenuto di neurotrasmettitore nei neuroni dopaminergici residui nel sistema nigro-striatale, la terapia farmacologica si avvale di una serie di agonisti dopaminergici derivati dall'ergot (bromocriptina, pergolide, lisuride, diidroergocriptina, cabergolina).

La bromocriptina e la lisuride agiscono da agonisti sui recettori D_2 ma da antagonisti dei recettori D_1 ; la lisuride è anche dotata di attività serotoninergica. La pergolide

è invece attiva come agonista su entrambi i sottotipi di recettori dopaminergici. Oltre ai derivati ergolinici, sono dotati di attività dopaminergica (sia D_1 che D_2) i derivati apomorfici come l'apomorfina. Sono inoltre a disposizione altri farmaci agonisti dopaminergici non derivati dell'ergot quali: ropinirolo, pramipexolo e piribedil (agonisti D_2 e D_3 , il piribedil è anche α_2 antagonista), rotigotina (agonista D_1 , D_2 e D_3). L'uso dei farmaci agonisti dopaminergici è secondario a quello della L-DOPA; la bromocriptina è utilizzata insieme alla levodopa in quei pazienti in cui il trattamento primario non assicura un'adeguata remissione sintomatologica o in cui gli episodi di "on-off" compaiono con eccessiva frequenza. L'uso di questi farmaci è limitato soprattutto per la comparsa di effetti collaterali dovuti all'attività dopaminergica periferica, come nausea, vomito e ipotensione posturale.

I farmaci antipsicotici sono antagonisti dei recettori D_2

I neurolettici, o antipsicotici, sono una classe di farmaci, eterogenea dal punto di vista chimico, che presentano la caratteristica specifica di controllare i sintomi fondamentali della schizofrenia, come l'agitazione psicomotoria e le turbe senso-percettive. Sono utilizzati sia nel controllo degli episodi acuti che nella prevenzione di recidive. Vengono distinti in due categorie: classici e atipici. Appartengono al primo gruppo i derivati fenotiazinici (clorpromazina, tioridazina, flufenazina), i derivati tioxanteni (clorprotixene, flupentixolo), i butirrofenoni (aloperidolo, droperidolo) e i derivati piperidinici (pimozide).

Una caratteristica che accomuna i farmaci antipsicotici (neurolettici) è la loro capacità di bloccare i recettori dopaminergici D_2 (proprietà che è alla base della teoria dopaminergica della schizofrenia). Molti di questi farmaci sono però anche capaci di bloccare, in misura variabile, i recettori D_1 e sono spesso anche dotati di attività antagonista sui recettori adrenergici α ; in particolare, l'antipsicotico clozapina è un potente antagonista α_1 ed è quasi del tutto privo di attività antidopaminergica. Inoltre molti di essi posseggono attività antimuscarinica e antistaminica.

Il trattamento con antipsicotici induce la comparsa di diverse sindromi neurologiche: alcune compaiono acutamente in concomitanza con la somministrazione dei farmaci, altre sono più tardive e possono comparire anche anni dopo l'inizio del trattamento. Di queste sindromi, il cosiddetto parkinsonismo iatrogeno riconosce come eziologia certa la competizione sui recettori dopaminergici. La sua incidenza varia fra i vari farmaci e può essere addirittura nulla in alcuni pazienti. Ginecomastia e galattorrea compaiono a dosi anche più basse di quelle antipsicotiche (probabilmente per l'assenza della barriera ematoencefalica a livello ipofisario) e l'effetto non va incontro a tolleranza. Spesso le alterazioni endocrine riguardano anche la secrezione di gonadotropine, estrogeni e progesterone, che probabilmente contribuiscono a indurre l'amenorrea che può comparire in donne trattate con clorpromazina. Lo stesso farmaco può portare a ridotta secrezione di ACTH, GH, ADH e di insulina.

Altri effetti collaterali riguardano il sistema cardiovascolare in cui l'effetto più comune è la comparsa di ipotensione, per lo più di tipo ortostatico.

Farmaci ad attività antidopaminergica sono utilizzati come antiemetici e in anestesologia

L'importanza del sistema dopaminergico nella funzionalità della CTZ e della motilità gastrointestinale è stata descritta in precedenza. Oltre ad alcuni farmaci antipsicotici, la terapia antiemetica si avvale anche di farmaci antidopaminergici che, come la metoclopramide, sono privi di effetti antipsicotici (ma possono indurre sindromi extrapiramidali e galattorrea perché passano la barriera

ematoencefalica) o che, come il domperidone, diffondono in quantità limitata attraverso la barriera ematoencefalica. L'attività antiemetica è anche dovuta agli effetti procinetici sullo svuotamento gastrico.

Alcuni neurolettici, come il derivato butirrofenonico droperidolo, producono un profondo stato di sedazione caratterizzato da riduzione dello stato d'ansia e dell'attività motoria, e aumentano la sensibilità ad altri farmaci capaci di deprimere l'attività del SNC. La concomitante somministrazione di un analgesico oppioide trasforma la sedazione in neurolepto-analgesia; con l'ausilio di protossido d'azoto, l'analgesia viene convertita in neurolepto-anestesia.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Il sistema nervoso autonomo regola il funzionamento di funzioni "viscerali" che non sono sotto il controllo volontario, tramite l'azione di due sistemi nervosi periferici ad attività generalmente contrapposta, l'ortosimpatico e il parasimpatico.
- ▶ L'attività simpatica del sistema nervoso autonomo è sostenuta dai neurotrasmettitori catecolaminergici: noradrenalina, adrenalina (sistemi noradrenergici) e dopamina (sistemi dopaminergici).
- ▶ Il sistema catecolaminergico ha una distribuzione peculiare e specifica anche nel sistema nervoso centrale.
- ▶ I recettori del sistema catecolaminergico appartengono alla famiglia dei recettori metabotropi accoppiati alle proteine G. Essi sono distinti in recettori adrenergici α e β (divisi a loro volta in sottotipi: 6 diversi recettori α , 3 diversi recettori β (ligandi endogeni: noradrenalina e adrenalina) e recettori dopaminergici (divisi in 5 sottotipi D1-D5) (ligando endogeno: dopamina).
- ▶ I farmaci che agiscono sul sistema noradrenergico trovano applicazione clinica soprattutto nell'ambito di patologie del sistema cardiovascolare.
- ▶ I farmaci che agiscono sul sistema dopaminergico trovano applicazione clinica soprattutto nell'ambito di patologie del sistema nervoso centrale.

Bibliografia essenziale

- ▶ Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience. Exploring the brain. 3th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- ▶ Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signalling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 2011;63:182-217.
- ▶ Frishman WH. Beta-Adrenergic blockers: a 50-year historical perspective. *Am J Ther* 2008; 15:565-76.
- ▶ Hawrylyshyn KA, Michelotti GA, Cogé F et al. Update on human alpha1-adrenoceptor subtype signalling and genomic organization. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25:449-55.
- ▶ Squire L, Berg D, Bloom F et al. *Fundamental neuroscience* Amsterdam: Elsevier, 2008.
- ▶ Weis WI, Kobilka BK. Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr Opin Struct Biol* 2008;18:734-40.
- ▶ Zametkin AJ, Liotta W. The neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 1998;59 Suppl7:17-23.

La trasmissione colinergica

Giancarlo Pepeu

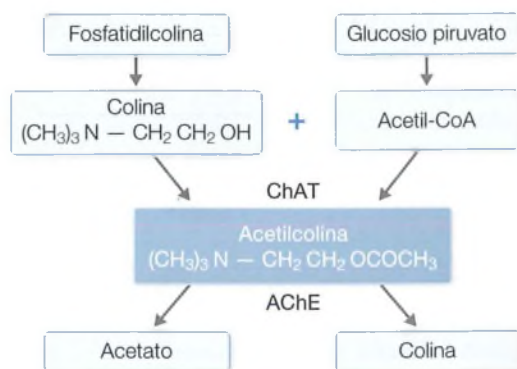
Obiettivi formativi

- ▶ Conoscere la neuroanatomia dei neuroni colinergici e delle loro terminazioni nel sistema nervoso centrale e periferico e il loro ruolo nella funzione motoria, nel sistema neurovegetativo e nei processi cognitivi
- ▶ Acquisire le conoscenze sui meccanismi molecolari che regolano sintesi, liberazione dalle terminazioni nervose e inattivazione dell'acetilcolina, necessarie per comprendere il meccanismo di azione dei farmaci che modificano la trasmissione colinergica
- ▶ Acquisire le conoscenze sui recettori sui quali agisce l'acetilcolina liberata dalle terminazioni nervose, sui loro sottotipi e sui meccanismi molecolari di trasduzione del segnale a essi associati, per capire le azioni dei farmaci che agiscono su di essi
- ▶ Acquisire conoscenze sulle azioni terapeutiche e tossiche dei farmaci che modificano la trasmissione colinergica a livello centrale e periferico

Il mediatore chimico della trasmissione colinergica è l'acetilcolina (ACh) (Figura 34.1) presente nel cervello in concentrazioni da 5 a 70 nmol/g a seconda delle regioni e della specie animale.

L'ACh fu sintetizzata da Bayer nel 1866, ben prima della sua scoperta in natura. Infatti, essa fu identificata da Ewins nel 1914 negli estratti di segale cornuta, da Dale e Dudley nel 1929 nella midollare surrenale di cavallo e da Chang e Gaddum nel cervello di mammiferi nel 1933. Il ruolo di neurotrasmettitore fu ipotizzato da Dale già nel

1913 sulla base delle analogie fra gli effetti cardiovascolari della stimolazione del vago e della somministrazione di ACh. Otto Loewi nel 1921 dimostrò nel cuore di rana che la stimolazione del vago è accompagnata dalla liberazione di una sostanza, da lui chiamata *Vagusstoff*, responsabile della bradicardia e della riduzione della forza di contrazione, azioni simili a quelle indotte dall'ACh. Nel decennio fra il 1930 e il 1940 fu dimostrato, mediante dosaggi biologici, che la stimolazione elettrica induce liberazione di ACh dai nervi splanchnici, dal vago, dalle fibre pregangliari simpatiche e dalle fibre motorie. Tuttavia la conferma definitiva della identità della *Vagusstoff* con l'ACh fu ottenuta solo nel 1970 con l'avvento della spettrometria di massa. La dimostrazione che l'ACh si libera dal midollo spinale fu ottenuta nel 1941 e dalla corteccia cerebrale da Elliott nel 1950.



AChE = acetilcolinesterasi; ChAT = colinaacetiltransferasi

FIGURA 34.1 Sintesi e metabolismo dell'ACh.

Distribuzione e funzioni dei sistemi colinergici

Nei mammiferi l'anatomia e le funzioni della trasmissione colinergica nel sistema nervoso periferico sono ben conosciute e riportate in tutti i trattati di Fisiologia. Anche la distribuzione dei neuroni colinergici nel sistema nervoso centrale cervello è nota e, negli ultimi anni, la loro funzione è stata in gran parte definita.

Trasmissione colinergica nel sistema nervoso periferico

L'ACh è il neurotrasmettitore responsabile della trasmissione degli impulsi nervosi nelle seguenti sinapsi periferiche.

1. Giunzioni fra le terminazioni del sistema parasimpatico e le cellule effettrici ghiandolari, pace-maker cardiache, muscolari lisce. L'ACh liberata dalle terminazioni vagali contribuisce anche alla regolazione della risposta infiammatoria riducendo la liberazione di TNF dai macrofagi.
2. Giunzioni fra fibre simpatiche postgangliari e ghiandole sudoripare. Le fibre nervose che regolano la secrezione sudorale sono di natura simpatica, dal punto di vista anatomico, ma nella gran maggioranza liberano ACh (simpatico colinergico).
3. Sinapsi fra le fibre pregangliari e i neuroni postgangliari di ambedue le sezioni del sistema neurovegetativo.
4. Giunzione fra le fibre simpatiche (nervo splanchnico) che innervano la ghiandola surrenale e le cellule della midollare surrenale e inducono la secrezione di catecolamine.
5. Giunzioni fra le terminazioni dei motoneuroni spinali e le cellule muscolari striate (placche neuromuscolari). L'ACh induce la contrazione muscolare depolarizzando la placca terminale delle giunzioni neuromuscolari.

In molte sinapsi la trasmissione colinergica può essere modulata da cotrasmettitori di natura polipeptidica, quali colecistochinina, sostanza P, VIP. Un esempio è il potenziamento dell'azione dell'ACh sulla secrezione salivare, osservata nel gatto, per interazione, a livello postsinaptico, con il polipeptide VIP co-liberato dalle fibre parasimpatiche che innervano le ghiandole salivari.

Il sistema colinergico non neuronale

Nell'uomo e in molte specie viventi, ACh e colina acetiltransferasi (ChAT), l'enzima che la sintetizza, sono state trovate in numerosi tessuti non nervosi quali eritrociti, cellule immunitarie, cellule endoteliali ed epiteliali, inclusi gli epitelii delle vie aeree, nella placenta e piccole quantità di ACh sono dimostrabili nel sangue. L'ACh è stata trovata anche in batteri, alghe, protozoi e in diverse piante. In molte cellule sono stati anche dimostrati recettori per l'ACh di tipo sia nicotinico che muscarinico. La funzione del sistema colinergico non neuronale, definita di tipo autocrino, non è stata ancora completamente chiarita. Esso contribuisce alla regolazione della circolazione ematica in quanto l'ACh causa una vasodilatazione generalizzata poiché stimola la produzione di nitrossido dagli endoteli vascolari e dagli eritrociti. Il nitrossido rilascia le fibre muscolari lisce dei vasi e modifica i parametri emoreologici. A livello bronchiale l'ACh liberata dalle cellule della mucosa bronchiale regola la funzione ciliare e la riparazione della mucosa. È presumibile che l'ACh non neuronale contribuisca, assieme all'ACh liberata dalle terminazioni vagali, al controllo colinergico dell'infiammazione.

Trasmissione colinergica nel sistema nervoso centrale

La distribuzione dei neuroni colinergici nel cervello umano è illustrata schematicamente dalla figura 34.2.

Procedendo in senso rostro-caudale troviamo i seguenti gruppi di neuroni.

1. I neuroni magnocellulari colinergici del cervello anteriore raggruppati in una serie di nuclei nel setto mediale, nella banda diagonale di Broca e nel nucleo basale di Meynert. Per la mancanza di una precisa corrispondenza con le strutture anatomiche, i gruppi di neuroni colinergici sono stati identificati da Mesulam con le sigle Ch1, nel setto mediale, Ch2 nella parte ascendente della banda di Broca, Ch3 nella parte orizzontale della banda di Broca e Ch4 nel nucleo di Meynert. I neuroni colinergici rappresentano dal 50 al 75% delle cellule presenti nelle rispettive regioni e le loro proiezioni formano la principale afferenza colinergica alla corteccia cerebrale, l'ippocampo, il bulbo olfattorio e l'amigdala.
2. Gli interneuroni colinergici del nucleo caudato e putamen.
3. I nuclei colinergici del tronco bulbo-mesencefalico nel nucleo tegmentale peduncolopontino (Ch5), nel nucleo tegmentale laterodorsale (Ch6), nel nucleo mediale abenulare (Ch7) e nel nucleo parabigeminali (Ch8). I neuroni colinergici del nucleo tegmentale peduncolopontino e del nucleo tegmentale laterodorsale inviano proiezioni principalmente al talamo, all'ipotalamo, al pallido e ai nuclei colinergici del cervello anteriore, quelli del nucleo mediale abenulare al nucleo

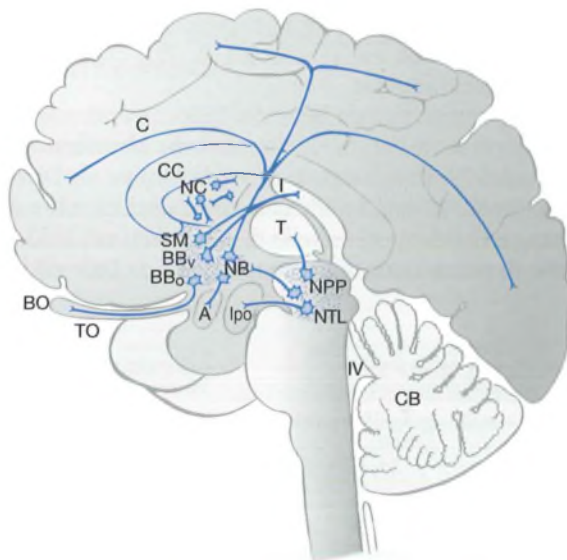


FIGURA 34.2 Rappresentazione schematica delle vie colinergiche cerebrali. A: abenula; BO: bulbo olfattorio; BB_v: lembo orizzontale della banda diagonale del Broca; BB_v: lembo verticale della banda diagonale del Broca; C: corteccia; CB: cervelletto; CC: corpo calloso; I: ippocampo; Ipo: ipotalamo; NB: nucleo basale magnocellulare; NC: nucleo caudato e putamen; NPP: nucleo tegmentale peduncolopontino; NTL: nucleo tegmentale laterodorsale; SM: setto mediale; T: talamo; TO: tratto olfattorio; IV: quarto ventricolo.

interpeduncolare e quelli del nucleo parabigemiale al collicolo superiore. Vanno infine ricordati alcuni gruppi di neuroni colinergici nell'ipotalamo, nella parte ventrolaterale del nucleo arcuato, che proiettano all'eminenza mediale.

Ruolo dei neuroni colinergici centrali nell'apprendimento e memoria, e nella regolazione dell'attività delle vie extrapiramidali.

Esperimenti negli animali e nell'uomo (vedi **CD**: Approfondimento 34.1. *Metodi di studio del ruolo del sistema colinergico cerebrale nei processi cognitivi*) hanno dimostrato il coinvolgimento del sistema colinergico del cervello anteriore, in particolare i neuroni dei nuclei Ch1-Ch4, nei processi cognitivi elencati nella tabella 34.1.

Il sistema colinergico non è coinvolto nella formazione della memoria a lungo termine. Il ruolo del sistema colinergico nei processi cognitivi è così complesso che alcuni Autori si sono recentemente posti la domanda se tutti i comportamenti umani, la coscienza e l'Io abbiano correlati colinergici. A sostegno di questa ipotesi si possono ricordare la difficoltà di attenzione e l'amnesia causata dalla somministrazione di atropina, scopolamina e altri farmaci anticolinergici. Inoltre la degenerazione dei neuroni colinergici del cervello anteriore, in particolare del nucleo di Maynert, della banda di Broca e del setto mediale, è una caratteristica della demenza di Alzheimer e delle demenze alcolica e pugilistica, nelle quali la perdita della capacità di attenzione e della memoria rappresentano i primi e più importanti sintomi.

Le proiezioni colinergiche dai nuclei Ch5 e Ch6 del tronco bulbomesencefalico al talamo, ai nuclei dopaminergici mesencefalici e ai nuclei colinergici del cervello anteriore influenzano il ciclo sonno-veglia e in particolare il sonno REM e contribuiscono all'attivazione comportamentale. Va inoltre ricordato che fibre colinergiche che originano dal nucleo basale regolano anche il flusso ematico regionale nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo, in quanto stimolano la produzione di NO.

I neuroni colinergici intrinseci del nucleo caudato e del putamen sono coinvolti nella regolazione extrapiramidale dei movimenti. Nel morbo di Parkinson e nei parkinsonismi la degenerazione o la disfunzione dei neuroni dopaminergici della sostanza nigra causano una riduzione del controllo dopaminergico sui neuroni colinergici. La loro iperattività è un elemento patogenetico importante nella comparsa della rigidità e dei tremori che compaiono in queste condizioni morbose, tanto che farmaci anticolin-

gici sono utilizzati nella terapia del morbo di Parkinson e per controllare i disturbi extrapiramidali causati da farmaci che bloccano i recettori dopaminergici, quali gli antipsicotici. I neuroni colinergici dello striato hanno un ruolo anche nella formazione della memoria implicita o non dichiarativa, cioè nell'apprendimento di procedure come guidare una macchina o risolvere problemi.

Il sistema colinergico del tronco bulbomesencefalico è coinvolto nella regolazione cardiovascolare. La sua attivazione con inibitori delle colinesterasi o con agonisti diretti induce un aumento della pressione arteriosa nell'uomo e in animali di laboratorio. I neuroni colinergici del nucleo arcuato sono coinvolti nella regolazione della secrezione dell'ormone della crescita in quanto modulano la liberazione ipotalamica di somatostatina. Infine, sono colinergici i motoneuroni spinali.

Le basi cellulari e molecolari del ruolo dell'ACh nei processi cognitivi coinvolgono l'attivazione di recettori nicotinici e muscarinici (vedi oltre), l'attivazione di geni precoci, la facilitazione nella corteccia e nell'ippocampo delle risposte alle afferenze sensoriali con un meccanismo di potenziamento a lungo termine che migliora il rapporto segnale-rumore di fondo nelle aree bersaglio e facilita la plasticità neuronale necessaria per la formazione della memoria (vedi **CD**: Approfondimento 34.1)

Sintesi e metabolismo dell'acetilcolina

L'ACh è sintetizzata a partire dalla colina e dall'acetilCoenzimaA per opera dell'enzima colina acetiltransferasi (ChAT) (Figura 34.1). La sintesi dell'ACh è regolata in modo che, in condizioni fisiologiche, la quantità di trasmettitore nei terminali nervosi sia mantenuta a un livello quasi costante in quanto la sintesi tiene il passo con la liberazione. Se la liberazione indotta dalla depolarizzazione è aumentata, la sintesi di ACh è accelerata per ripristinarne il livello intraneuronale. La disponibilità dei precursori, la concentrazione dei prodotti della reazione e l'attività dell'enzima sono i fattori che regolano la sintesi e i livelli di ACh. L'ACh liberata dalle terminazioni colinergiche nello spazio sinaptico è inattivata per idrolisi catalizzata dalle colinesterasi, principalmente dalla acetilcolinesterasi (AChE), ma anche dalla butirrilcolinesterasi (BChE), ed è allontanata per diffusione.

■ **L'ACh è sintetizzata dalla colina acetiltransferasi**

La ChAT, enzima di 60-70 kDa, è codificata da un singolo gene posto nel locus colinergico sul cromosoma umano 10 nella posizione 10q11.2-10. Questo gene contiene anche la sequenza codificante per il trasportatore vescicolare dell'ACh (VACHT1, *Vesicular Ach Transporter1*). La ChAT è presente nei neuroni colinergici, di cui è un marker fenotipico, ma si trova, in concentrazioni più basse, anche in cellule non neuronali, come già detto nel paragrafo sulla distribuzione dell'ACh, quali eritrociti, linfociti, cellule epiteliali, nella placenta e in batteri e piante.

Nei neuroni colinergici la ChAT è presente in eccesso nei neuroni e non è considerata il fattore limitante

TABELLA 34.1 Processi cognitivi nei quali è coinvolto il sistema colinergico del cervello anteriore

Attenzione, attenzione sostenuta
Memoria di lavoro
Memoria spaziale
Memoria esplicita o dichiarativa
Codificazione delle informazioni
Controllo sensori-motorio

della sintesi dell'ACh in quanto non è saturata dalle concentrazioni di colina presenti nella cellula. Il fattore limitante la sintesi dell'ACh è il trasporto della colina nei terminali nervosi. Gli ormoni tiroidei, gli estrogeni, e numerose neurotrofine, la più importante delle quali è il *Nerve Growth Factor* (NGF), aumentano l'espressione della ChAT neuronale e ne regolano l'attività a lungo termine. Nella regolazione a breve termine, l'attività catalitica è controllata dalle variazioni dell'ambiente ionico dei terminali nervosi, dal grado di fosforilazione, mediato dalle chinasi, e dalla distribuzione subcellulare. Nelle terminazioni nervose la ChAT esiste in due forme, una solubile e una legata alle membrane. Esse hanno differenti proprietà fisicochimiche e biochimiche. La forma solubile è idrofila, quella legata è anfifilica. Si ritiene che la frazione legata alla membrana sia accoppiata al sistema di trasporto della colina e rappresenti la forma più importante dal punto di vista fisiologico. La forma solubile è considerata il precursore della forma legata. Sono stati sintetizzati alcuni inibitori specifici della ChAT, fra essi il più usato a fini sperimentali è l'*N*-metil-4-(1-naftilvinil) piridinio.

■ *Colina e acetilCoenzimaA sono i precursori dell'ACh*

La colina per la sintesi dell'ACh deriva dalla colina libera nel plasma e da quella dei fosfolipidi, principalmente della fosfatidilcolina (lecitina). Quest'ultima viene fornita all'organismo con il cibo. Una quota compresa fra il 35 e il 50% della colina che si forma per idrolisi dell'ACh liberata nello spazio intersinaptico viene nuovamente utilizzata per la sintesi di ACh. Un efficiente sistema omeostatico mantiene costanti i livelli di colina nel plasma (circa 10 μM) e quelli extracellulari nel cervello (circa 3 μM) e, in condizioni di normale attività neuronale, impedisce di aumentare la sintesi di ACh mediante somministrazione di colina. La colina dell'organismo è utilizzata per la sintesi dei fosfolipidi delle membrane cellulari, la parte maggiore, e per la sintesi di ACh. Nel primo caso essa viene trasportata attraverso le membrane da un sistema di captazione a bassa affinità presente in tutte le cellule. Nel secondo caso essa è trasportata da un meccanismo di captazione ad alta affinità Na^+ -dipendente, chiamato CHT1 (*Choline Transporter 1*). Esso è costituito da una proteina del peso di circa 60 kDa che contiene 13 domini transmembrana ed è omologo ai membri della famiglia del trasportatore del glucosio Na^+ -dipendente. Mediante un anticorpo specifico è stato possibile studiarne la distribuzione e dimostrare che esso è espresso solo nei neuroni colinergici e nelle loro terminazioni.

La disponibilità di colina è il fattore limitante la sintesi di ACh e la capacità del sistema di captazione aumenta proporzionalmente alla liberazione e alla necessità di sintesi del trasmettitore: ad esempio nel ratto aumenta nella corteccia frontale nel corso di comportamenti sostenuti da attivazione colinergica, come l'attenzione. Pertanto le variazioni della V_{max} del trasportatore riflettono l'attività dei neuroni colinergici. Diverse proteine regolatrici, cambiamenti post-traduzionali e lo spostamento dal pool citoplasmatico alle membrane dei terminali sono i meccanismi coinvolti nella regolazione dell'attività di

CHT1. La captazione ad alta affinità della colina è inibita dall'emicolinio-3 (HC3). La somministrazione di HC3 inibisce la sintesi di ACh con una conseguente progressiva riduzione della sua liberazione fino al blocco della trasmissione colinergica.

L'acetil-CoA necessario per la sintesi dell'ACh origina dal glucosio e dal piruvato ed è formato nei mitocondri. Il meccanismo mediante il quale l'acetil-CoA o i gruppi acetilici sono trasportati attraverso la membrana mitocondriale non è ancora stato chiarito. È possibile che l'acetil-CoA sia convertito in citrato e successivamente ritrasformato in acetil-CoA nel citosol, o che i gruppi acetilici siano trasportati sotto forma di acetilcarnitina. È stato dimostrato che in condizioni di intensa liberazione di ACh è possibile aumentarne la sintesi con la somministrazione sia di glucosio che di colina.

■ *L'ACh è idrolizzata dalle colinesterasi (ChE)*

Nel cervello e nei tessuti periferici vi sono due tipi di ChE, l'acetilcolinesterasi (AChE) e la butirrilcolinesterasi (BChE). Esse appartengono alla famiglia delle serina idrolasi e sono espresse da due geni diversi ma con una omologia del 65% della sequenza amminoacidica. L'AChE idrolizza preferenzialmente l'ACh, la BChE idrolizza la butirrilcolina che è un composto di sintesi usato come substrato per differenziare i due enzimi. Ambedue gli enzimi sono presenti nel sistema nervoso, ma nel cervello umano l'attività dell'AChE è da 1,5 a 60 volte maggiore di quella della BChE, a seconda delle regioni, e ambedue gli enzimi sono presenti nei neuroni e nella glia. L'AChE si trova anche nei globuli rossi e la BChE nel plasma e nel fegato e pertanto hanno anche funzioni non connesse con la trasmissione colinergica.

L'AChE nei neuroni colinergici è sintetizzata nel pericario ed è poi trasportata ai dendriti e agli assoni dove viene inserita nelle membrane come un ectoenzima. Essa è uno degli enzimi più efficienti che si conoscano in quanto idrolizza 5000 molecole di ACh per secondo per sito enzimatico, e ha la funzione di inattivare prontamente l'ACh presente nello spazio intersinaptico.

Ambedue gli enzimi esistono in diverse forme molecolari, che derivano dallo stesso gene per splicing alternativo e differiscono per la struttura quaternaria, la solubilità e il modo di attacco alle membrane sinaptiche, ma hanno uguale attività catalitica. Di questi enzimi sono noti la struttura tridimensionale, la localizzazione del sito attivo, costituito da un sito anionico che attrae la carica positiva dell'ACh e un sito esterasico, e il meccanismo catalitico (vedi CD: Approfondimento 34.2. *Colinesterasi e inibitori*). In passato si era ritenuto che per la sua distribuzione e rapidità di azione, l'AChE fosse l'enzima responsabile dell'idrolisi dell'ACh liberata dalle terminazioni nervose e che la BChE, anche per la sua presenza nel plasma, non fosse coinvolta nella trasmissione nervosa ma idrolizzasse altri esteri. Tuttavia è stato dimostrato recentemente che anche la somministrazione di inibitori selettivi della BChE, quali la N^1 -fenilettilnorscopolina, causa un aumento dei livelli extracellulari di ACh e che topolini nei quali è stato deletato il gene per l'AChE, e sono quindi privi di

questo enzima, sopravvivono grazie all'azione vicariante della BChE, sia pure con numerose anomalie.

Si conoscono alterazioni genetiche dell'espressione della BChE che ne riducono l'attività. I soggetti colpiti possono presentare risposte abnormi a farmaci che sono normalmente idrolizzati dalle colinesterasi, ad esempio la succinilcolina (vedi Capitolo 53).

Sono noti numerosi inibitori delle colinesterasi che vengono distinti in reversibili e irreversibili, selettivi o non selettivi per le due forme di ChE (Figura 34.3). I farmaci anticolinesterasici sono substrati alternativi e danno origine a un enzima carbamitato o fosforilato che è idrolizzato lentamente. Sono inibitori reversibili l'edrofonio (ad azione rapida, in quanto si lega solo al sito anionico dell'enzima), i derivati carbammici (fisostigmina o eserina, neostigmina, prostigmina e rivastigmina), la tetraidroaminoacridina (tacrina) e il donepezil e la galantamina. Inibitori irreversibili sono gli esteri organici del fosforo, o alchilfosfati, fra i quali ricorderemo il DFP, il tabun, il sarin, il parathion, l'ecotiopato e il metrifonato. Nel caso degli inibitori carbammici, l'idrolisi richiede da diversi minuti, come per la fisostigmina, ad alcune ore per la rivastigmina. Durante questo tempo l'enzima non è in grado di inattivare l'ACh. Gli inibitori reversibili sono impiegati in terapia in condizioni nelle quali è utile potenziare la trasmissione colinergica, ad esempio nella miastenia grave, nel glaucoma, nell'ileo paralitico postoperatorio, in anestesia e nella demenza senile di Alzheimer (vedi CD: Approfondimento 34.2). L'edrofonio per la sua azione rapida è usato solo per la diagnosi *ex adiuvantibus* della miastenia. Nel caso degli alchilfosfati, il legame fra enzima e residuo è molto stabile e il tempo per l'idrolisi supera quello della biosintesi e turnover di nuovo enzima e pertanto l'inibizione è praticamente irreversibile. Gli inibitori organofosforici più potenti e

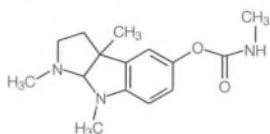
volatili sono utilizzati come aggressivi chimici (gas nervini), i meno potenti come insetticidi. La maggior parte degli anticolinesterasici ha maggiore affinità per la BChE che per la AChE la quale è inibita selettivamente solo da pochi composti fra i quali l'ambinonio e il donepezil. La N¹-fenilettilcimerina è il più potente inibitore selettivo della BChE. Nella prima fase della reazione fra enzima e alchilfosfati è possibile riattivare l'enzima mediante la somministrazione di composti altamente nucleofili che staccano il residuo fosforico dall'enzima. Il più noto riattivatore nucleofilo è la piridina-2-aldoxima iodometilato (pralidossima ioduro) la cui tempestiva somministrazione permette di prevenire o attenuare l'intossicazione. La possibilità di riattivare l'enzima è persa dopo qualche ora perché l'enzima va incontro a un processo di "invecchiamento" che lo converte in una forma che non può più essere defosforilata. Il processo di invecchiamento è dovuto alla idrossilazione dell'atomo di fosforo legato all'enzima. Esteri fosforici con gruppi alchilici secondari o terziari aumentano la stabilità dell'enzima fosforilato. Nell'intossicazione da anticolinesterasici predominano i sintomi periferici causati da iperfunzione del sistema parasimpatico e i disturbi della trasmissione neuromuscolare che portano a paralisi muscolare (vedi CD: Approfondimento 34.2).

Accumulo intracellulare e rilascio dell'acetilcolina

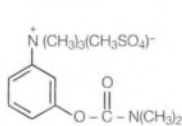
L'ACh è accumulata nelle vescicole sinaptiche

Nelle terminazioni, l'ACh è accumulata in vescicole sinaptiche a una concentrazione circa 100 volte maggiore di quella presente nel citoplasma. Si calcola che ogni ve-

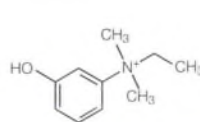
Fisostigmina o eserina



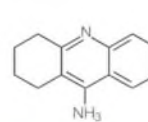
Neostigmina



Edrofonio

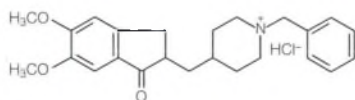


Tacrina

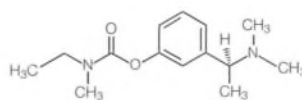


Inibitori usati per la malattia di Alzheimer

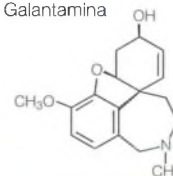
Donepezil



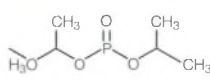
Rivastigmina



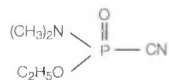
Galantamina



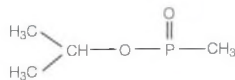
Inibitori irreversibili



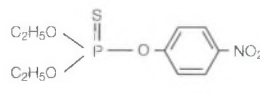
Diisopropilfluorofosfato DFP



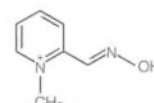
Etil-N-dimetilfosforamidocianidato TABUN



Isopropilmetilfluorofosfato SARIN



O,O-dietil-(4nitrofenil)-fosforotioato Parathion (antiparassitario)



Pralidossima metilioduro Reattivatore

FIGURA 34.3 Gli inibitori delle colinesterasi.

scicola contenga circa 2000 molecole di ACh. Il processo mediante il quale avviene questo accumulo è simile a quello degli altri trasmettitori classici e coinvolge almeno due componenti macromolecolari presenti nella membrana delle vescicole. Il primo è una ATP-asi che pompa protoni nella vescicola sinaptica e ne acidifica l'interno. Il secondo componente è il trasportatore VACHT1 che scambia uno o più protoni della vescicola con l'ACh citoplasmatica. Il VACHT1 è una glicoproteina di 500-600 amminoacidi e un peso molecolare di 75 kDa (vedi Capitolo 17). Il gene che esprime questo trasportatore è stato identificato ed è contiguo a quello che codifica la ChAT nel cosiddetto "operon colinergico". VACHT1 è bloccato selettivamente dal vesamicolo (*trans*-2-(4-fenilpiperidino)cicloesano). Nelle vescicole l'ACh è contenuta assieme ad ATP, in un rapporto che varia da 5 a 10 molecole di ACh per una di ATP. L'ATP è liberato assieme all'ACh durante la stimolazione delle terminazioni nervose, ma il ruolo fisiologico di questa co-liberazione non è stato ancora definito, anche tenuto conto che l'ATP può agire come neurotrasmettitore (vedi Capitolo 33). Inoltre, le vescicole contengono ioni Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e K^+ e proteoglicano ricco di cariche negative il cui ruolo sarebbe di mantenere l'equilibrio osmotico ed elettrico delle vescicole.

■ Il rilascio di acetilcolina

Il rilascio o liberazione di ACh, indotta dalla depolarizzazione causata dagli stimoli nervosi, avviene per esocitosi Ca^{2+} -dipendente, mediante un complesso meccanismo che vede l'intervento di numerose proteine. Fra queste SNARE e SM congiungono la membrana delle vescicole a quella plasmatica. Sinaptotagmina (sensore per i Ca^{2+}) e complessina controllano il rilascio dell'ACh attraverso il formarsi di pori il cui meccanismo d'apertura non è ancora stato chiarito (vedi anche Capitolo 15).

L'esocitosi è bloccata dalle botulino-tossine prodotte dal bacillo anaerobio *Clostridium botulinum*. Le botulino-tossine, di cui esistono diversi sierotipi, sono metalloproteasi che, dopo essersi fissate specificamente alle terminazioni colinergiche ed essere internalizzate, scindono SNARE e così inattivano il meccanismo di esocitosi delle vescicole sinaptiche causando un blocco di lunga durata della funzione sinaptica. Le botulino-tossine sono causa di gravi intossicazioni, spesso mortali, di origine alimentare. Le botulino-tossine A e B sono impiegate in terapia per iniezioni locali. Il loro uso si è esteso dal trattamento dello strabismo e del blefarospasmo fino a includere molte condizioni neurologiche e mediche dovute a iperattività muscolare quali distonia, spasticità, anche della muscolatura liscia, tic, tremori ecc. Infine le botulino-tossine A e B hanno un larghissimo impiego in medicina estetica per la riduzione delle rughe facciali.

La liberazione dell'ACh dai terminali ha carattere quantale. Nelle giunzioni neuromuscolari, accanto al rilascio quantale spontaneo (che genera miniature end-plate potentials, m.e.p.p.) o evocato (che genera il potenziale postsinaptico eccitatorio, EPSP), vi è un rilascio continuo non quantale di ACh la cui funzione fisiologica è ignota.

La quantità di ACh liberata dipende dalla frequenza di scarica dei neuroni colinergici ed è modulata a livello presinaptico, soprattutto nel SNC, da autorecettori muscarinici e nicotinici ed eterorecettori. La modulazione non interessa in maniera uguale tutte le terminazioni, ma presenta differenze regionali. L'attivazione degli autorecettori muscarinici induce una inibizione della liberazione che non supera il 30-40% e serve, presumibilmente per impedire che si accumulino ACh nello spazio intersinaptico. Gli autorecettori nicotinici stimolano la liberazione di ACh e sono stati identificati sui neuroni colinergici del nucleo basale e sulle terminazioni delle fibre motorie. Non sono ancora state identificate le situazioni fisiologiche nelle quali essi sono attivati. Gli eterorecettori presinaptici sono di tipo inibitorio e sono rappresentati da alcuni dei sottotipi dei recettori 5-HT e da recettori $GABA_A$, α_2 e A_1 rispettivamente per noradrenalina e adenosina. L'attività dei neuroni colinergici è regolata da numerosi neurotrasmettitori liberati da fibre che formano sinapsi con essi. Vi sono rilevanti differenze regionali. Nello striato gli interneuroni colinergici sono inibiti da recettori D_2 per la dopamina. Nei nuclei del setto e basale i neuroni colinergici sono sotto il controllo di interneuroni GABAergici la cui attività è regolata da fibre glutammatergiche e di altra natura. I neuroni del nucleo basale sono attivati da recettori dopaminergici D_1 e da recettori NMDA per il glutammato. Altri neurotrasmettitori che inibiscono i neuroni colinergici, con marcate differenze distrettuali, sono le enkefaline, la galanina e l'istamina. Attivano i neuroni colinergici, sempre con marcate differenze regionali il TRH, la sostanza P e la colecistochinina. L'esistenza di una così complessa modulazione pre- e postsinaptica dei neuroni colinergici del SNC dimostra che i neuroni colinergici rappresentano una via finale comune regolata da segnali provenienti da molti sistemi neuronali.

Recettori colinergici

Vi sono due classi di recettori per l'ACh: nicotinici (recettori-canale) e muscarinici (accoppiati a G proteine)

La classica suddivisione dei recettori per l'acetilcolina in nicotinici e muscarinici, proposta da Dale nel 1913, basata sulle risposte alla nicotina e alla muscarina, alcaloide estratto dal fungo *Amanita muscaria*, è stata confermata dalle differenze della loro struttura molecolare e dei meccanismi di trasduzione del segnale: i recettori nicotinici sono recettori-canale, quelli muscarinici sono accoppiati a proteine G.

Recettori nicotinici

L'ACh agisce su recettori nicotinici (nAChR) (Tabella 34.2) situati alle giunzioni neuromuscolari, nei gangli, sulle cellule cromaffini e nel sistema nervoso centrale. Gli nAChR appartengono al gruppo dei recettori-canale specifici per i cationi (vedi Capitolo 12). La loro attiva-

zione da parte dell'ACh o della nicotina causa l'apertura di un canale ionico seguita da depolarizzazione e dalla risposta dell'effettore. Gli nAChR si presentano in diverse conformazioni funzionali: a riposo, aperti e desensibilizzati. L'apertura del canale indotta dagli agonisti è seguita da desensibilizzazione che può essere rapida o lenta, a seconda delle concentrazioni dell'agonista. Il persistere di alte concentrazioni di ACh nello spazio sinaptico, come nel corso di intossicazioni da inibitori della AChE, la somministrazione di alte dosi di nicotina e di bloccanti neuromuscolari di tipo depolarizzante, quali la succinilcolina, causa desensibilizzazione dei recettori e un blocco della trasmissione sinaptica. Sono chiamati antagonisti i liganti che stabilizzano il recettore in conformazione chiusa quali i curari non depolarizzanti, competitivi (vedi **CD**: Approfondimento 34.3. *I bloccanti neuromuscolari*). Sono stati sintetizzati anche modulatori allosterici degli nAChR che, legandosi fuori dal sito specifico per l'ACh, modificano la conformazione funzionale dei recettori. Da un punto di vista farmacologico, è noto da tempo che gli nAChR della giunzione neuromuscolare (detti recettori muscolari) sono diversi da quelli delle sinapsi gangliari e delle cellule cromaffini e del SNC (detti recettori neuronali). Ad esempio l' α -bungarotossina a basse concentrazioni blocca gli nAChR muscolari ma non ha effetto sulla maggioranza di quelli neuronali, la mecamilamina blocca gli nAChR gangliari ma non quelli muscolari. Gli antagonisti dei recettori periferici vengono distinti, in base ai loro effetti, in ganglioplegici, bloccanti della trasmissione gangliare, e curari, bloccanti delle giunzioni neuromuscolari (vedi **CD**: Approfondimento 34.3).

■ Il recettore nicotino muscolare

L'organizzazione molecolare dell'nAChR muscolare è conosciuta in dettaglio ed è stata già descritta nel Capitolo 6. Esso è posto sulla sommità delle pieghe della membrana postsinaptica ed è costituito da 5 subunità che formano una struttura a rosetta di 9 nm di diametro contenente un canale ionico di 1,5-2 nm. Il peso molecolare dell'nAChR muscolare è di 250 kDa e le 5 subunità che lo compongono sono state chiamate α , β , δ , γ , ϵ e sono presenti in un rapporto stechiometrico di 2,1,1,1,1. Il sito di legame per l'ACh e gli agonisti è una tasca idrofobica

formata all'interfaccia fra subunità adiacenti. La maggioranza delle tasche risulta da un'ansa della subunità α . L'ampia zona citoplasmatica fra la 3^a e la 4^a porzione transmembranale sarebbe importante per la regolazione citoplasmatica del recettore. Le sequenze amminoacidiche delle diverse unità hanno più dell'80% di omologia. La regione deputata al passaggio degli ioni presenta una porzione allargata extracellulare, detta vestibolo, le cui cariche negative contribuiscono a concentrare i cationi nel suo interno. Il vestibolo si restringe nel canale transmembranario, che presenta una strettoia di 0,7-0,8 nm di diametro. La struttura del recettore fa sì che il legame con l'agonista determini l'apertura del canale in microsecondi mediante un riarrangiamento dei legami idrogeno fra gli amminoacidi vicini al sito di legame.

■ Numerosi sottotipi di recettori nicotinici neuronali

Gli nAChR neuronali sono anch'essi pentameri e sono definiti omomerici o eteromerici. I primi sono costituiti da un solo tipo di subunità, in genere α_7 , i secondi da due tipi di subunità, α e β , in rapporto stechiometrico di 2 α e 3 β . Di ciascuna subunità esistono diversi tipi e a tutt'oggi sono state clonate 8 subunità α e 3 subunità β neuronali con una omologia fra di loro del 50-70%. Esse sono distribuite in maniera non uniforme nelle aree cerebrali. Nel SNC le subunità più diffuse sono α_4 , α_7 e β_2 e il 90% dei recettori è di tipo $\alpha_4\beta_2$. Nell'ippocampo il 70% è costituito da recettori α_7 . Nei gangli periferici gli nAChR sono formati soprattutto da subunità α_3 e β_4 . Utilizzando oociti di *Xenopus* iniettati con mRNA specifici sono state caratterizzate le proprietà farmacologiche degli nAChR in funzione della combinazione di subunità da cui sono formati. I recettori composti da subunità α_3 o α_4 e β_2 e β_4 formano canali ad alta conduttanza per lo ione Na^+ , aperti dalla nicotina e bloccati dalla β -eritroidina e dalla n-bungarotossina ma non dalla α -bungarotossina. Benché il sito di legame dell'ACh sia presente sulla subunità α , sembra che il tipo di subunità β espresso dal recettore neuronale sia molto importante per definirne il profilo farmacologico. Ad esempio, la presenza di subunità β_4 al posto delle β_2 porta a una sensibilità alta per la citisina e bassa per la nicotina. Le subunità α_7 e

TABELLA 34.2 I recettori nicotinici

Tipo (composizione in subunità)	Muscolari		Neuronali (principali sottotipi)			
	$\alpha_1\beta_1/\gamma\epsilon\delta$	α_7	$\alpha_4\beta_2$	$\alpha_3\beta_4$	$\alpha_4\alpha_5\beta_2$	$\alpha_4\alpha_6\beta_2$
Localizzazione	Giunzioni neuromuscolari	SNC gangli pre- e postsinaptici	SNC presinaptici	Ippocampo, pineale, locus coeruleus, retina	Striato, nucleo accumbens	Nucleo accumbens, VTA-SN
Permeabilità ionica	Na^+	Ca^{2+}	Na^+	Na^+	Na^+	Na^+
Agonisti	ACh, succinilcolina	colina, epibatidina	epibatidina, nicotina	citisina, nicotina,	TC-2559	—
Antagonisti selettivi	α -bungarotossina, α -conotossina, pancuronio	α -bungarotossina, metillicaconitina	DH β E, mecamilamina	α -CnxAuIB	—	α -CnxBMII

α -CnxBMII: α -conotossina MII; α -CnxAuIB: α -conotossina AuIB; DH β E: diidro β eritroidina; TC-2559: (E)-N-metil-4-[3-(5-octane-3,2'-(3'H)furo[2,3-b]piridina.

α_8 hanno la caratteristica di legare la α -bungarotossina e di formare un canale ionico permeabile al Ca^{2+} anche in assenza di subunità β .

La creazione di topi *knockout* o *knockin*, nei quali le subunità sono state rimosse o specifici amminoacidi sono stati mutati, ha allargato le conoscenze sul ruolo fisiologico dei sottotipi recettoriali. Ad esempio, in topi privi di subunità β_2 la nicotina perde la sua capacità di indurre dipendenza e di facilitare l'apprendimento. Nella demenza di Alzheimer diminuisce il numero di recettori $\alpha_4\beta_2$ ma non α_7 e polimorfismi dei recettori α_7 sono stati trovati in pazienti schizofrenici. Infine l'esistenza di sottotipi degli nAChR ha permesso la sintesi di agonisti nicotinici con specifiche proprietà terapeutiche.

Recettori muscarinici

■ Sono recettori accoppiati alle G proteine

I recettori muscarinici (mAChR) mediano molte azioni dell'ACh nei sistemi nervoso vegetativo e centrale e sono la sede di azione di numerosi farmaci.

Mediante tecniche di biologia molecolare sono stati identificati 5 geni (m1-m5) che codificano 5 sottotipi di mAChR, suddivisibili in due sottoclassi M_1 e M_2 , la prima composta dai recettori M_1 , M_3 e M_5 e la seconda dai recettori M_2 e M_4 , le cui caratteristiche e proprietà sono riassunte nella tabella 34.3. Gli mAChR sono membri della superfamiglia di recettori accoppiati a proteine G descritti nel Capitolo 7. Essi presentano un alto grado di omologia soprattutto nei domini transmembranari mentre vi sono marcate differenze nella sequenza amminoacidica delle anse intracitoplasmatiche. Il legame fra l'agonista e il recettore avviene in una tasca al centro dell'anello formato dai 7 territori transmembrana e determina una serie di cambiamenti di conformazione che inducono l'accoppiamento con proteine G. A seconda della G proteina con cui sono accoppiati e dei meccanismi di trasduzione a esse associati, i singoli mAChR possono esercitare funzioni diverse. Mediante accoppiamento con proteine G della classe $G_{q/11}$ e G_p , insensibili alla tossina della pertosse, i recettori M_1 , M_3 e M_5 stimolano la fosfolipasi C, inducendo la formazione dei secondi messaggeri IP_3 e DAG e inibiscono le correnti di K^+ ; i recettori M_2 possono

anche attivare l'adenilciclasi, tramite l'accoppiamento a una proteina G_s , e la proteinchinasi A; i recettori M_2 e M_4 interagiscono con proteine della classe $G_{i/o}$, sensibile alla tossina della pertosse, inibiscono l'adenilciclasi e hanno anche effetto stimolante sulla fosfolipasi C. Inoltre i recettori M_2 e M_4 aprono, sempre tramite una proteina G, conduttanze rettificanti in entrata per il K^+ e inibiscono conduttanze per il Ca^{2+} . Nelle cellule cardiache del nodo del seno, i recettori M_2 sono accoppiati, mediante una proteina G_o , a canali per il K^+ la cui apertura è responsabile della bradicardia indotta dall'ACh. Un contributo fondamentale alla comprensione del ruolo fisiologico dei sottotipi di mAChR è venuto dalla produzione di topolini *knockout* per ciascuno dei sottotipi e dall'uso delle "tossine muscariniche" (MT). Esse sono proteine presenti nel veleno di serpenti africani che si legano con elevata affinità e specificità ai diversi sottotipi di mAChR esercitando effetti agonisti o antagonisti. Ad esempio, la MT7 si lega ai recettori M_1 con affinità picomolare e agli altri recettori muscarinici con affinità micromolare.

Farmaci attivi sui recettori colinergici

Farmaci attivi sui recettori nicotinici

■ Gli agonisti nicotinici hanno impieghi clinici limitati

A parte l'ACh, il principale agonista dei recettori nicotinici è la nicotina, estratta dalla *Nicotiana tabaci*, pianta originaria dell'America Centrale. La nicotina, assunta soprattutto con il fumo delle sigarette, esercita complesse azioni stimolanti e inibenti sul SNC e autonomo e ha una forte capacità di indurre dipendenza. La nicotina può essere somministrata per via transdermica per la disassuefazione dal fumo; il suo impiego è stato proposto nei disturbi cognitivi della demenza senile di Alzheimer, nella sindrome de la Tourette e nell'ileite di Crohn, ma i risultati clinici sono limitati. Oltre alla nicotina, vi sono in natura altri agonisti degli nAChR: la citisina, agonista parziale dei recettori contenenti la subunità β_2 , l'epibatidina potente agonista dei recettori $\alpha_4\beta_2$ e $\alpha_3\beta_4$, ma non molto selettivo, e la colina che agisce con bassa potenza sui recettori α_7 . Numerosi agonisti sono stati sintetizzati; di essi ricordiamo

TABELLA 34.3 I recettori muscarinici

Sottotipo	M_1	M_2	M_3	M_4	M_5
Proteine G	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$	$G_{i/o}$	$G_{q/11}$
Meccanismo di trasduzione	↑ IP_3 , DAG ↑ Ca^{2+} intracell ↑ cAMP	↓ cAMP ↑ canale K^+ ↓ correnti Ca^{2+}	↑ IP_3 , DAG ↑ Ca^{2+} intracell ↑ cAMP	↓ cAMP ↑ canale K^+ ↓ correnti Ca^{2+}	↑ IP_3 , DAG ↑ Ca^{2+} intracell ↑ cAMP
Agonisti	ACh, CCh, McNA433	ACh, CCh	ACh, CCh	ACh, ?	ACh, ?
Antagonisti selettivi	Pirenzepina MT7, 4-DAMP	Tripitramina, AFDX384	4-DAMP darifenacina	MT3 darifenacina	4-DAMP

CCh: carbacolo; DAG: diacilglicerolo; IP_3 : inositoltrifosfato; ↑: aumenta; ↓: diminuisce
MT3 e MT7: tossine del serpente mamba verde; 4-DAMP: 4-difenilacetossi-N-metilpiperidina metilioduro;
AFDX384: 5,11-dihidro-11-((2-(2-((dipropylamino) methyl)-1-piperidinyl)ethyl)amino)carbonyl)-6H-pyrido(2,3-b)(1,4)-benzodiazepin-6-one metanesulfonate.

il carbacolo, estere della colina attivo sia sugli nAChR che sugli mAChR (vedi **CD**: Approfondimento 34.4. *Principali interventi farmacologici sul sistema colinergico*) e il dimetilpiperazino (DMPP). La vareniclina, (7,8,9,10-tetraidro-6,10-metano-6H-pirazino (2,3-h)(3) benzazepine), è un derivato dalla citisina, agonista parziale dei recettori $\alpha_4\beta_2$, indicato nella dipendenza da fumo. Alcuni nuovi agonisti dei recettori α_7 sono in avanzata sperimentazione clinica per il trattamento dei disturbi cognitivi della schizofrenia e della demenza di Alzheimer.

Gli antagonisti sono paralizzanti muscolari utilizzati in anestesia

Gli antagonisti nicotinici sono classificati in ganglioplegici e curari. Dei ganglioplegici solo il trimetafano e la mecamilamina sono ancora utilizzati in terapia. Il trimetafano, disponibile anche in Italia, è usato nelle gravi crisi ipertensive e per indurre una ipotensione controllata nel corso di interventi chirurgici, la mecamilamina, inizialmente usata come antipertensivo, è un'ammina secondaria che penetra nel cervello, blocca i recettori $\alpha_3\beta_4$ e viene oggi proposta per il trattamento della dipendenza da nicotina. Numerosi curari, non depolarizzanti, antagonisti competitivi, quali la d-tubocurarina, il pancuronio e l'atracurio, e la succinilcolina, curaro-depolarizzante, sono usati come coadiuvanti in anestesia, per ottenere rilasciamento muscolare in corso di interventi chirurgici (vedi **CD**: Approfondimento 34.4).

Farmaci attivi sui recettori muscarinici

Gli agonisti hanno un uso terapeutico limitato

Oltre all'ACh, vi sono altri agonisti dei recettori mAChR con diversa selettività per i sottotipi degli mAChR. Di essi alcuni sono di origine naturale, quali la muscarina, alcaloide estratto dall'*Amanita muscaria*, l'arecolina dalla noce di betel, *Areca catechu*, e la pilocarpina estratta dalle foglie del *Pilocarpus jaborandi*. La maggior parte degli agonisti sono tuttavia di sintesi. Fra di essi i primi a essere stati sintetizzati sono gli esteri della colina, betanecolo, carbacolo e metacolina. (Figura 34.4). Il carbacolo è più attivo sugli nAChR che sugli mAChR ed è relativamente

inattivo sui recettori M_1 verso i quali ha invece spiccata selettività il derivato butinilico McNA343. Molto usata in laboratorio è l'ossotremorina attiva prevalentemente sui recettori M_2 . Negli ultimi anni sono stati sintetizzati numerosi nuovi agonisti muscarinici con lo scopo di migliorare i disturbi cognitivi nella demenza di Alzheimer. I risultati clinici sono stati sinora deludenti. Fra questi composti ricordiamo la cevimelina e la xanomelina.

Gli impieghi terapeutici degli agonisti muscarinici sono limitati. La pilocarpina è usata come miotico e per stimolare la salivazione; per lo stesso scopo la cevimelina, agonista parziale M_1 viene usata nella sindrome di Sjögren. Pilocarpina, carbacolo e aceclidina sono usati come miotici e nel glaucoma ad angolo stretto, il betanecolo trova impiego nella ritenzione urinaria e nell'ileo paralitico, la metacolina è stata somministrata in alcune forme di tachicardia e come vasodilatatore nelle vasculopatie periferiche. L'arecolina è l'unico agonista muscarinico le cui azioni centrali siano sfruttate. Infatti le popolazioni dell'Asia sudorientale masticano sia la noce che le foglie di betel per ottenere, oltre a un aumento della salivazione, un leggero senso di euforia. La xanomelina, agonista selettivo per i recettori M_1 e M_2 , è attualmente oggetto di studi clinici per il trattamento dei disturbi cognitivi della schizofrenia. Tutti gli agonisti muscarinici inducono effetti collaterali di tipo parasimpatico, di grado più o meno intenso, a seconda delle dosi.

Gli antagonisti muscarinici hanno molteplici usi in terapia

Gli antagonisti degli mAChR sono numerosi e hanno molteplici impieghi in terapia. Essi sono comunemente chiamati parasimpaticolitici in quanto aboliscono gli effetti della stimolazione del parasimpatico e devono le loro azioni a una competizione reversibile con l'ACh per il sito di legame. I due principali parasimpaticolitici sono l'atropina, alcaloide estratto dall'*Atropa belladonna* e la scopolamina ottenuta dallo *Hyoscyamus niger*, dalla *Scopolia carniolica* e dalla *Datura stramonium*, piante appartenenti alla famiglia delle solanacee. La scopolamina ha azioni più intense di quelle dell'atropina sul SNC, ma non vi sono sostanziali differenze fra i due farmaci. Di ambedue gli alcaloidi sono stati preparati derivati

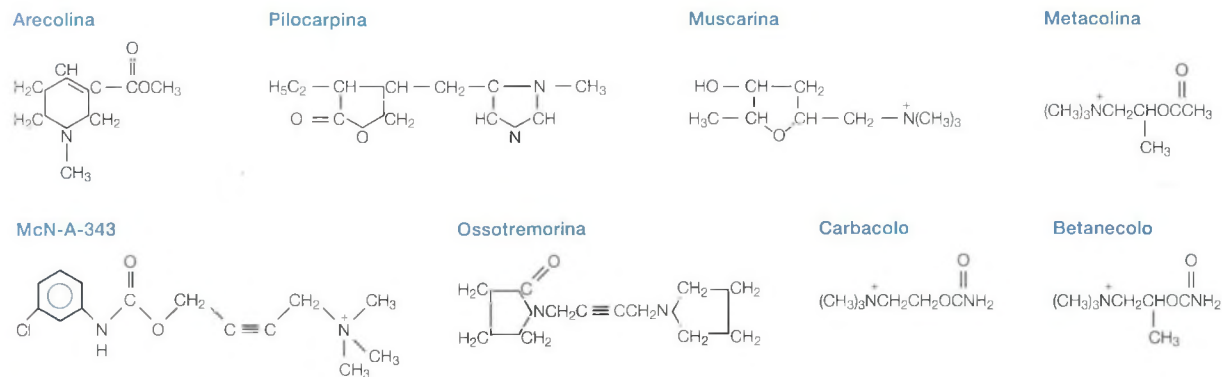


FIGURA 34.4 Agonisti dei recettori muscarinici.

quaternari, atropina metilnitrato e scopolamina metil e butilbromuro, che non passano la barriera ematoencefalica ed esercitano solo azioni a livello periferico. Atropina e scopolamina e i loro derivati sono antagonisti non selettivi degli mAChR in quanto ne bloccano tutti i sottotipi. La pirenzepina, usata in gastroenterologia, è un antagonista di sintesi selettivo per i recettori M₁. I farmaci parasimpaticolitici di sintesi sono numerosi e sono impiegati in oculistica, gastroenterologia, cardiologia, urologia, patologia respiratoria, neurologia (vedi CD: Approfondimento 34.4).

Secchezza delle fauci, stipsi, ritenzione urinaria, tachicardia, midriasi, amnesia sono i più comuni effetti collaterali che accompagnano la somministrazione di anticolinergici, specialmente nei pazienti anziani. Questi effetti possono comparire, come effetti collaterali, durante il trattamento con antistaminici (ad esempio, difenidramina, prometazina), antidepressivi (imipramina, amitriptilina), antipsicotici (ad esempio, clorpromazina, tioridazina, clozapina) che, accanto alla loro azione principale, hanno anche azioni anticolinergiche, sia pure di intensità molto minore di quelle dell'atropina.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ La trasmissione colinergica è presente nella scala filogenetica a partire dai protozoi e si è evoluta nei mammiferi localizzandosi in alcune aree del sistema nervoso centrale, nel sistema motorio, nel sistema neurovegetativo, in particolare nel parasimpatico e in alcuni distretti del simpatico.
- ▶ L'acetilcolina liberata dalle terminazioni colinergiche agisce su diversi sottotipi di recettori, classificati in muscarinici e nicotinici, mediante i quali induce e regola i movimenti volontari, la visione, il battito cardiaco, la motilità intestinale, la secrezione di numerose ghiandole e, nel sistema nervoso centrale, attiva i meccanismi dell'attenzione e quindi permette l'apprendimento.
- ▶ I farmaci attivi sul sistema colinergico possono agire sulla liberazione dell'acetilcolina, sugli enzimi che la inattivano e sui recettori sui quali essa agisce.
- ▶ I farmaci detti colinomimetici attivano e i farmaci detti colinolitici bloccano la trasmissione colinergica e, data la molteplicità di azioni dell'acetilcolina, hanno molti impieghi terapeutici.
- ▶ I farmaci colinolitici si dividono in parasimpaticolitici, se bloccano i recettori muscarinici del sistema parasimpatico (atropina e analoghi), bloccanti neuromuscolari (curari) e ganglioplegici se bloccano i recettori nicotinici alle giunzioni neuromuscolari o gangliari.
- ▶ I farmaci che attivano il sistema colinergico possono facilitare i processi cognitivi (nicotina) anche in alcune patologie (inibitori delle colinesterasi nella malattia di Alzheimer).

Bibliografia essenziale

- ▶ Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 2009; 89:73-120.
- ▶ Bennarroch EE. Acetylcholine in the cerebral cortex: effects and clinical implications. *Neurology* 2010;75:659-65.
- ▶ Fadel JR. Regulation of cortical acetylcholine release: Insights from in vivo microdialysis studies. *Behav Brain Res* 2011;221:527-36.
- ▶ Giacobini E, Pepeu G (eds). The brain cholinergic system in health and disease. Abingdon: Informa Health Care, 2006.
- ▶ Gotti C, Clementi F, Fornari A et al. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem. Pharmacol* 2009;78:703-1.
- ▶ Rosas-Ballina M, Tracey KJ. Cholinergic control of inflammation. *J Int Med* 2009;265:663-79.
- ▶ Sarter M, Parikh V, Howe WM. Phasic acetylcholine release and the volume transmission hypothesis: time to move on. *Nat Rev Neurosci* 2009;10:383-90.
- ▶ Servent D, Fruchart-Gaillard C. Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem* 2009;109:1193-202.
- ▶ Wess J, Eglen RM, Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:721-33.
- ▶ Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 2008;154:1558-71.

La trasmissione serotoninergica

Maurizio Popoli, Laura Musazzi, Giorgio Racagni

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire conoscenze per la comprensione dei principali ruoli (centrali e periferici) della serotonina: funzioni a livello cerebrale, cardiovascolare, gastrointestinale, genitourinario, endocrino e nocicettivo
- ▶ Acquisire conoscenze sul ciclo metabolico della serotonina (sintesi endogena, accumulo vescicolare, liberazione esocitotica, spegnimento del segnale e catabolismo)
- ▶ Acquisire conoscenze sui recettori serotoninergici (meccanismi recettoriali, localizzazione e funzioni fisiologiche)
- ▶ Acquisire conoscenze sugli effetti farmacologici di composti che modulano la trasmissione serotoninergica

La prima scoperta della 5-idrossitriptamina va attribuita al farmacologo italiano Vittorio Erspamer il quale, negli anni 30 del secolo scorso, osservò che le cellule cromaffini della mucosa intestinale contengono notevoli quantità di una sostanza a struttura allora ignota, ma dotata di svariate attività biologiche, che lo studioso denominò *enteramina*. Ricerche successive indipendenti portarono il gruppo di I.H. Page a caratterizzare un fattore presente nel siero che, essendo dotato di attività vasocostrittiva, venne chiamato serotonina. Solo più tardi si scoprì che *enteramina* e *serotonina* rappresentavano la stessa molecola, il 3-(β -aminoetil)-5-idrossiindolo, un derivato indolico più comunemente denominato 5-idrossitriptamina (5-HT).

Funzioni e distribuzione del sistema serotoninergico

Dei circa 10 mg presenti nell'organismo, circa il 95% della 5-HT è sintetizzato nelle cellule enterocromaffini del tratto intestinale. La 5-HT da esse rilasciata nel sangue viene captata dalle piastrine, che la accumulano in granuli di secrezione e la liberano durante l'aggregazione. Inoltre la 5-HT è prodotta da neuroni presenti nel sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP). Per molti anni la 5-HT è stata studiata soprattutto in relazione al suo ruolo nella modulazione del comportamento e nella fisiopatologia di malattie neuropsichiatriche. È oggi chiaro però che essa è coinvolta nella modulazione di una vasta gamma di processi fisiologici e fisiopatologici nell'intero

organismo (Figura 35.1) che includono l'aggregazione piastrinica e le funzioni del sistema cardiovascolare, la peristalsi e il sistema gastrointestinale, la glicemia e il bilancio energetico, il metabolismo osseo, il sistema della respirazione, le funzioni sessuali, il ciclo sonno-veglia, il controllo del dolore e il sistema nocicettivo.

5-HT e sistema nervoso centrale: modulazione del comportamento e malattie neuropsichiatriche

Nonostante i neuroni che producono e rilasciano 5-HT siano non più di 300 mila in tutto il SNC (su un totale di circa 100 miliardi), questo trasmettitore modula virtualmente tutti i processi psicobiologici legati al comportamento, incluso l'umore, l'aggressività, la percezione, l'attenzione, la gratificazione, la memoria, l'appetito, la sessualità.

I corpi cellulari dei neuroni serotoninergici sono localizzati principalmente sulla linea mediana del tronco cerebrale a livello di bulbo, ponte e mesencefalo, dove si ritrovano particolarmente concentrati nei nuclei del rafe (Figura 35.2). Le proiezioni dei neuroni serotoninergici dei nuclei del rafe innervano in modo diffuso le diverse aree di telencefalo, diencefalo, midollo spinale e cervelletto. I nuclei del midollo ventrolaterale e del rafe magno proiettano al midollo spinale e innervano soprattutto le lamine I e II delle corna dorsali; essi innervano anche il nucleo sensitivo principale e il nucleo spinale del trigemino suggerendo un coinvolgimento di queste vie serotoninergiche nel controllo delle vie nocicettive. Inoltre il nucleo del rafe magno proietta alla sostanza grigia periacqueduttale, al nucleus coeruleus e ad altri nuclei

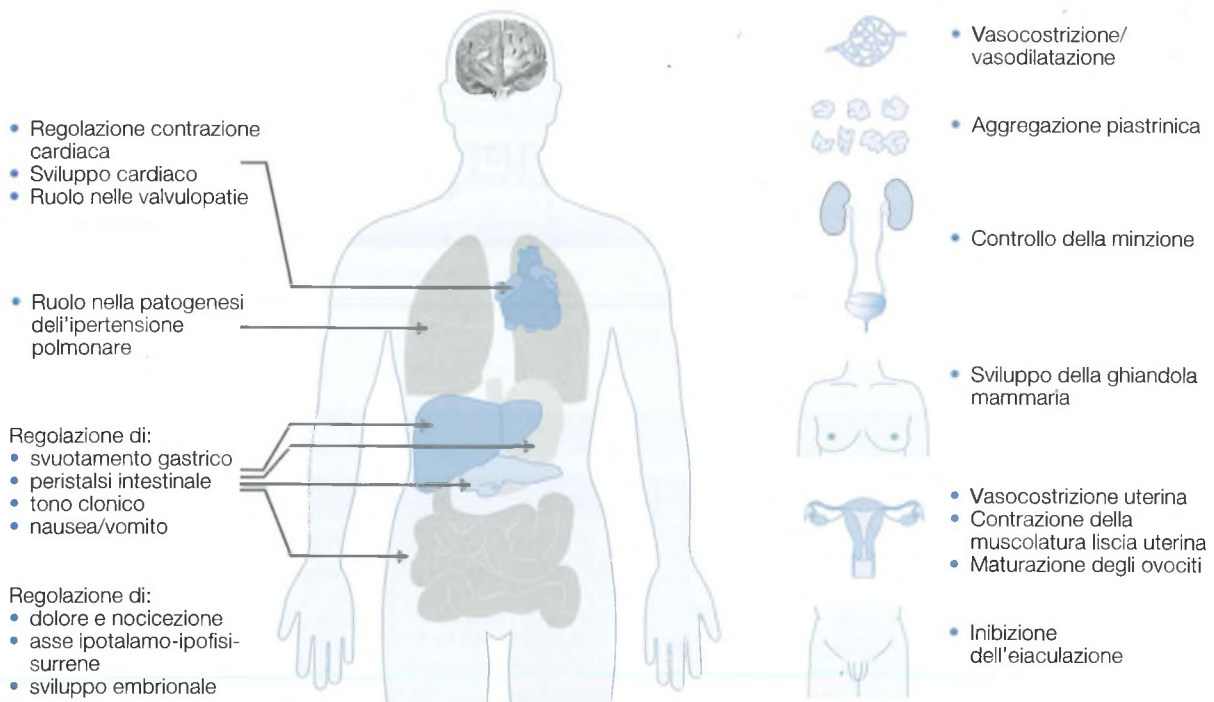


FIGURA 35.1 Ruolo del sistema serotonergico nella modulazione dei processi fisiologici e fisiopatologici dell'organismo.

noradrenergici coinvolti nella modulazione soprasspinale della percezione del dolore.

L'innervazione di nuclei del cervelletto e dell'oliva inferiore da parte dei neuroni serotonergici principalmente del nucleo dorsale e mediale del rafe spiegano il ruolo di questo mediatore nel timing e nella coordinazione di sequenze motorie. Tutti i nuclei del rafe proiettano a varie e diffuse zone della corteccia, al talamo, all'amigdala ai nuclei della base, al pallido e al nucleo accumbens. Innervazione serotonergica è presente anche nell'ippocampo, nell'ipotalamo e nella neuroipofisi.

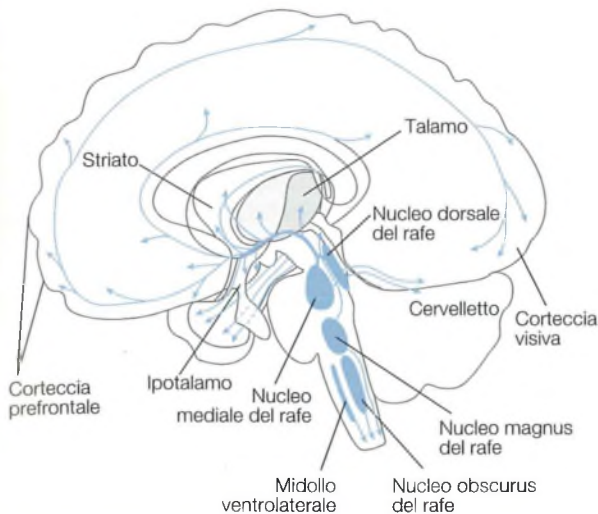
I neuroni serotonergici contengono spesso altri neurotrasmettitori, come la galanina, la sostanza P, le encefaline e, spesso, anche gli enzimi che sintetizzano il monossido di azoto. Questo rende il quadro della trasmissione serotonergica ancora più complesso. Inoltre, il sistema serotonergico è strettamente connesso, sia anatomicamente, sia funzionalmente, con altri sistemi neurotrasmettitoriali, per cui l'attività di farmaci attivi su un sistema è generalmente accompagnata da modificazioni dello stato funzionale degli altri.

La varietà e l'importanza dei processi psicobiologici modulati dalla 5-HT, la rilevanza che farmaci attivi sul sistema serotonergico hanno in psichiatria (in particolare gli inibitori della ricaptazione di 5-HT) e, infine, il fatto che diverse sostanze d'abuso interferiscono con la funzionalità di questo sistema hanno portato al convincimento che non esista disturbo della sfera psichica nel quale non sia coinvolto, in modo più o meno esteso, il sistema serotonergico.

È noto da molti anni che la 5-HT è coinvolta nella fisiopatologia di malattie psichiatriche, in particolare depressione, ansia, disturbo ossessivo-compulsivo, psicosi,

tossicodipendenza e disturbi dell'alimentazione. In stretta relazione con questo ruolo della 5-HT, molti farmaci, il cui bersaglio è il sistema serotonergico, sono utilizzati per il trattamento di malattie psichiatriche, in particolare la depressione e l'ansia (vedi CD: Approfondimento 35.1. *Farmaci che agiscono sul sistema serotonergico*). Sette famiglie di recettori per 5-HT, con almeno 14 diversi sottotipi, sono state clonate e caratterizzate farmacologicamente (vedi oltre). Per molti di essi è stato analizzato il coinvolgimento nelle patologie; ad esempio, il comportamento ansioso sembra essere regolato principalmente da recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C}. Quest'ultimo recettore è stato anche implicato nella regolazione del metabolismo e nella dipendenza. Dato che ogni tipo di comportamento è regolato da diversi recettori serotonergici, questo spiega perché anche farmaci con affinità per uno specifico recettore mostrano effetti su diversi processi comportamentali.

Lesioni del sistema serotonergico negli animali da laboratorio producono comportamenti aggressivi e disinibiti. Ad esempio, topi KO per il recettore 5-HT_{1B} sviluppano un comportamento aggressivo (Tabella 35.1), che si osserva anche in topi e in uomini portatori di una mutazione nel gene della monoamino ossidasi di tipo A (MAO-A), principale enzima responsabile del catabolismo di 5-HT. Queste osservazioni hanno suggerito che una funzione importante del sistema serotonergico sia quella di sopprimere comportamenti eccessivamente aggressivi o altre attività psicomotorie che comportano conseguenze negative. È opinione prevalente che una deficienza di 5-HT sia associata con un comportamento aggressivo sia nei roditori che nei primati. Alcuni studi su pazienti suicidi hanno mostrato un sistema serotonergico labile, con un minore numero di trasportatori per la serotonina

**Effetti comportamentali**

Controllo di:

- umore
- memoria
- aggressività
- paura
- risposta allo stress
- appetito
- dipendenze
- sessualità

Altri effetti sul SNC

Controllo di:

- movimento
- sonno/ritmi circadiani
- tono vascolare
- emesi
- centri del respiro
- temperatura corporea

FIGURA 35.2 Principali vie serotoninergiche nel sistema nervoso centrale umano ed effetti sulla sua funzione.

nel SNC, un aumentato numero di recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} e minori livelli di 5-HT e di acido 5-idrossi-3-indolacetico (5-HIAA, metabolita della 5-HT) nella corteccia prefrontale e nel liquido cerebrospinale.

La 5-HT ha anche effetti inibitori sul comportamento sessuale (in parte dovuti a modulazione della produzione di ormoni sessuali), sulla sensibilità al dolore e sull'appetito; ha influenza sulla modulazione della temperatura corporea, regola il livello dell'umore ed è importante nel controllo del vomito.

La 5-HT è anche un importante regolatore del sistema sonno-veglia controllando sia i meccanismi di risveglio che quelli del sonno, a seconda delle strutture nervose e dei recettori attivati. Farmaci che interferiscono con l'attività delle vie serotoninergiche hanno quindi importanti effetti sul sonno che possono essere positivi (riduzione dell'insonnia nella depressione), oppure negativi (insonnia nel trattamento con inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina).

■ 5-HT e sistema cardiovascolare

Gli effetti della 5-HT sul sistema cardiocircolatorio sono molteplici e complessi (Figura 35.1), con notevoli variazioni tra le diverse specie e mediati da recettori diversi. La 5-HT gioca diversi ruoli nel sistema cardiovascolare, che includono il controllo dell'emostasi e la funzione piastrinica, il controllo della pressione sanguigna, il controllo del funzionamento cardiaco.

Le piastrine mancano degli enzimi deputati alla sintesi della 5-HT, ma possiedono un trasportatore capace di

captare il neurotrasmettitore presente nel sangue. Quasi tutta la 5-HT presente nel sangue è infatti immagazzinata nelle piastrine. Quando le piastrine vengono attivate da alcuni segnali, come quelli prodotti in una emorragia (danni all'endotelio vasale, ischemia), rilasciano vari fattori, incluso 5-HT, che promuovono l'emostasi. La 5-HT, legando recettori 5-HT_{2A} sulle piastrine, promuove l'aggregazione e la formazione di trombi; inoltre 5-HT esercita un effetto in prevalenza vasoconstrictore sui vasi sanguigni. Gli effetti sul tono vasale sono complessi e dovuti a meccanismi diversi, quali: a) attivazione di recettori 5-HT_{1A} localizzati sui neuroni dei nuclei vasomotori, che mediano ipotensione; b) inibizione del rilascio di noradrenalina dalle terminazioni ortosimpatiche; c) attivazione della produzione di nitrossido (NO) da parte di cellule endoteliali (probabilmente attraverso l'attivazione di recettori 5-HT₂). Vari recettori sono implicati negli effetti sul tono vascolare (5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT₄, 5-HT₇), ma il ruolo specifico di ogni recettore è ancora in corso di studio. È da notare che nel distretto coronarico la 5-HT induce costrizione dei vasi di grosso e medio calibro e dilatazione delle piccole arterie. Gli inibitori selettivi della ricaptazione di 5-HT (SSRI; vedi CD: Approfondimento 35.1), la classe di farmaci antidepressivi più usati in clinica, possono ridurre l'aggregazione e aumentare la durata di emorragie perché inibiscono la ricaptazione e l'accumulo di 5-HT da parte delle piastrine. Di converso, numerosi dati suggeriscono che il trattamento con SSRI potrebbe ridurre il rischio di infarto del miocardio.

Inoltre 5-HT esercita i suoi effetti sulla funzionalità cardiaca a partire dai neuroni dei nuclei del rafe. Mediante l'attivazione di meccanismi simpatici e parasimpatici, 5-HT esercita effetti cronotropi e inotropi sul cuore. L'attivazione di recettori 5-HT_{1A} induce inibizione simpatica e bradicardia, mentre l'attivazione di recettori 5-HT_{2A} induce attivazione simpatica, con aumento di pressione e tachicardia. Il recettore 5-HT₃, presente sulle terminazioni afferenti vagali media un effetto noto come "riflesso von Bezold-Jarish", che rappresenta una delle possibili cause di sincope (sincope neurocardiogenica), caratterizzata da bradicardia e ipopnea. Il riflesso può essere innescato da una vasodilatazione delle vene periferiche, un aumento compensativo della contrattilità cardiaca e conseguente attivazione paradossa della risposta vagale, che produce una rapida e transitoria bradicardia seguita da una risposta ipotensiva e tachicardia riflessa. Quest'ultima sembra essere dovuta ad attivazione di recettori 5-HT₄ cardiaci, che mediano effetti cronotropi e inotropi positivi nel miocardio.

Gli effetti della stimolazione di recettori 5-HT₄ sul miocardio sono stati suggeriti anche dal riscontro di fibrillazione atriale in pazienti con sindrome di Brugada, inducono sovrapproduzione di 5-HT, e dall'aumento di espressione di 5-HT₄ nello scompenso cardiaco. 5-HT gioca anche un ruolo nella patogenesi di scompenso cardiaco come è stato scoperto nel trattamento con il farmaco **tegaserod** e la combinazione di farmaci **fenelzina**, un cocktail antidepressante popolare alcuni anni fa, poi ritirato dal mercato a causa dei suoi pericolosi effetti avversi.

TABELLA 35.1 Recettori serotoninergici: principali effettori, distribuzione, funzione recettoriale e fenotipo del topo knockout (se esistente)

Nome	Effettore	Distribuzione	Funzione	Fenotipo topo knockout
5-HT _{1A}	G _{i/o} ↓ AC ↑ PLC ↑ Canali K ⁺ ↓ Canali Ca ²⁺	Ippocampo, corteccia cingolata ed entorinale, setto, talamo, amigdala, bulbo olfattorio, rafe, ipotalamo, midollo, rene, TGI	Autorecettori in neuroni serotoninergici del rafe. Recettori postsinaptici in aree limbiche. ↑ rilascio acetilcolina in TGI	↑ responsabilità a 5-HT ↑ fenotipo ansioso ↑ risposta a stress ↑ sonno ↓ apprendimento e memoria a lungo termine
5-HT _{1B}	G _{i/o} ↓ AC ↑ PLC	Nuclei della base (sostanza nera, globo pallido, caudato, putamen), corteccia frontale, rafe, ippocampo, arterie cerebrali	Autorecettori ed eterorecettori su neuroni GABAergici, acetilcolinici e glutammatergici	↑ aggressività ↓ memoria a breve e lungo termine ↑ risposta a cocaina
5-HT _{1D}	G _{i/o} ↓ AC ↑ PLC	Nuclei della base (sostanza nera, globo pallido, caudato, putamen), rafe, midollo spinale	Autorecettori ed eterorecettori su neuroni GABAergici, acetilcolinici e glutammatergici	—
5-HT _{1E}	G _{i/o} ↓ AC	Corteccia frontale ed entorinale, caudato, putamen, claustrum, ippocampo, amigdala	Eterorecettori postsinaptici	—
5-HT _{1F}	G _{i/o} ↓ AC	Corteccia olfattiva, caudato, putamen, ippocampo, rafe, corteccia frontale e cingolata, claustrum, amigdala, ipotalamo, talamo	Autorecettori (?)	—
5-HT _{2A}	G _{q/11} ↑ PLCβ	Corteccia cerebrale, claustrum, bulbo olfattorio, tronco encefalico, sistema limbico, nuclei basali, vasi sanguigni, muscolatura liscia, piastriane	Eterorecettori somatodendritici su neuroni dopaminergici, GABAergici, acetilcolinici e glutammatergici	↓ fenotipo ansioso ↓ nocicezione
5-HT _{2B}	G _{q/11} ↑ PLCβ	Cervelletto, setto, ipotalamo, amigdala	Eterorecettori	Letale
5-HT _{2C}	G _{q/11} ↑ PLCβ	Plesso coroideo, ippocampo, amigdala, corteccia piriforme e cingolata, bulbo olfattorio, nuclei talamici e subtalamici, sostanza nera	Eterorecettori somatodendritici su neuroni dopaminergici, GABAergici e glutammatergici	Obesità Convulsioni spontanee ↓ apprendimento e memoria ↑ risposta a cocaina
5-HT ₃	Canale cationico	Complesso vagale dorsale, ippocampo, amigdala, corteccia cerebrale, SNP, TGI, sistema cardiovascolare	Eterorecettori su neuroni GABAergici, acetilcolinici e glutammatergici	↓ nocicezione (5-HT _{3A})
5-HT ₄	G _s ↑ AC ↓ Correnti K ⁺	Setto, ippocampo, amigdala, striato, sostanza nera, TGI, sistema cardiovascolare	Eterorecettori somatodendritici su neuroni GABAergici, acetilcolinici e glutammatergici	↓ risposta allo stress ↑ risposta ad agenti convulsivanti
5-HT ₅	G _{i/o} ↓ AC	Ippocampo, ipotalamo, bulbo olfattorio, corteccia cerebrale, talamo, striato, ponte, cervelletto	Eterorecettori su neuroni GABAergici (?)	↑ attività esplorativa ↓ risposta a LSD
5-HT ₆	G _s ↑ AC	Striato, amigdala, nucleo accumbens, ippocampo, bulbo olfattorio, corteccia cerebrale	Eterorecettori su neuroni GABAergici, acetilcolinici e glutammatergici	Alterata risposta all'alcol
5-HT ₇	G _s ↑ AC	Sistema cardiovascolare, muscolatura liscia intestinale, talamo, ippocampo, corteccia cerebrale, amigdala, nucleo soprachiasmatico	Eterorecettori su neuroni GABAergici e glutammatergici	↑ fenotipo "simil-antidepressivo"

TGI: tratto gastrointestinale

■ 5-HT e sistemi gastrointestinale e genitourinario

Le funzioni del sistema serotoninergico nel tratto gastrointestinale (GI) sono complesse, non omogenee e molto diverse da specie a specie. Nell'uomo 5-HT regola le funzioni del tratto gastrointestinale a vari livelli, inclusi lo svuotamento gastrico, le secrezioni e la peristalsi intestinale (Figura 35.1). Quando il cibo entra nel tratto GI, viene spinto lungo l'intestino da onde peristaltiche che sono modulate da 5-HT, rilasciata da cellule enterocromaffini in risposta a vari segnali (acetilcolina, stimolazione simpatica, aumento della pressione intraluminale, abbassamento del pH). 5-HT attiva recettori

presenti su neuroni sia intrinseci (contenuti nello spessore del tratto GI) che estrinseci (al di fuori del tratto GI). I primi inducono contrazioni peristaltiche e riflessi secretori, mentre i secondi permettono la comunicazione tra i sistemi simpatico e parasimpatico e il tratto GI. Queste connessioni sono implicate nelle sensazioni di nausea, vomito, dolore nel tratto GI, nonché negli effetti secondari di alcuni farmaci che aumentano la disponibilità di 5-HT (SSRI; vedi CD: Approfondimento 35.1). Inoltre la 5-HT controlla nausea e vomito anche a livello cerebrale, in particolare tramite recettori 5-HT₃ (vedi oltre). 5-HT rilasciata nel tratto GI regola anche la secrezione di enzimi pancreatici, comunicando il bi-

sogno di enzimi esocrini rilasciati dal pancreas in base allo stato e al contenuto del tratto GI.

Il sistema serotoninergico gioca un ruolo importante nel controllo delle funzioni genitourinarie. 5-HT aumenta la latenza dell'eiaculazione e ritarda l'orgasmo attraverso la stimolazione di recettori 5-HT_{2C} e 5-HT_{1B}, mentre esercita un effetto opposto attraverso il recettore 5-HT_{1A}. L'effetto netto è quello di ritardare eiaculazione e orgasmo. 5-HT modula la minzione in modo simile all'eiaculazione. I circuiti spinali che controllano l'attività della vescica sono intensamente innervati da fibre serotoninergiche. Una attivazione di queste fibre porta a una riduzione del tono parasimpatico e a una attivazione del sistema simpatico, con conseguente aumento della capacità della vescica dovuta a una diminuzione dello svuotamento.

■ 5-HT, metabolismo e sistema endocrino

Il sistema serotoninergico è importante anche nel controllo centrale del bilancio energetico e nella modulazione dell'asse ipotalamo-ipofisario-surrenale (HPA) (Figura 35.1). Si ritiene che i recettori 5-HT_{2C} ipotalamici abbiano un ruolo centrale nella regolazione della omeostasi del glucosio e del bilancio energetico. Per questo motivo agonisti 5-HT_{2C} sono stati proposti per il trattamento dell'obesità e del diabete. Alcune evidenze hanno suggerito che 5-HT abbia un effetto ipoglicemizzante, mediato da recettori 5-HT_{2A} espressi nei muscoli scheletrici, dovuto a un aumento del trasportatore di glucosio a livello di membrana cellulare. I livelli di 5-HT sono bassi nei soggetti affetti da diabete di tipo I ed è stato suggerito che questa carenza serotoninergica potrebbe contribuire alla maggiore incidenza di malattie psichiatriche associate a questa patologia.

Il sistema serotoninergico regola la secrezione di ormoni steroidei e prolattina, regola l'asse HPA a vari livelli ed esercita effetti complessi sulla risposta allo stress. Ci sono anche evidenze di una regolazione serotoninergica del metabolismo osseo. È stato infatti dimostrato che osteoblasti e osteociti esprimono trasportatore e recettori per 5-HT, e che gli SSRI, aumentando la disponibilità di 5-HT, riducono la massa ossea.

■ 5-HT, controllo del dolore e anestesia

Il sistema serotoninergico controlla la percezione del dolore a vari livelli nel SNC e nel SNP. Nell'infiammazione di tessuti il rilascio locale di 5-HT sensibilizza fibre nervose periferiche che trasportano informazioni nocicettive al SNC. Inoltre i nuclei mesencefalici del rafe inviano proiezioni discendenti al midollo spinale che riducono l'ingresso di informazioni nocicettive. Infine i nuclei del rafe inviano proiezioni ascendenti a regioni limbiche e corticali del cervello che modulano la percezione del dolore. È stato dimostrato che pazienti affetti da disturbi dell'umore mostrano una aumentata percezione del dolore, legata ad alterazioni nella modulazione serotoninergica della percezione del dolore. Il complesso coinvolgimento del sistema serotoninergico nella modulazione del dolore spiega l'efficacia di farmaci serotoninergici nel

trattamento del dolore. Alcuni antidepressivi triciclici sono usati nella terapia del dolore e i triptani sono attivi nella cefalea mediante l'attivazione di recettori talamici (vedi **CD**: Approfondimento 35.2. *Sistema serotoninergico e modulazione della percezione del dolore*).

Sintesi e metabolismo della serotonina

■ La sintesi inizia dall'amminoacido L-triptofano

Il precursore della serotonina è l'amminoacido L-triptofano che è fornito dalla dieta e trasportato all'interno delle cellule dal trasportatore degli amminoacidi neutri. Dal momento che esiste competizione tra gli amminoacidi neutri per il trasportatore, la biodisponibilità di L-triptofano è legata al tipo di dieta; diete ricche di carboidrati favoriscono la sintesi di L-triptofano. Anche altri amminoacidi possono modulare la concentrazione cerebrale del triptofano, competendo per il trasporto a livello della barriera ematoencefalica.

La sintesi di serotonina inizia con l'idrossilazione enzimatica del precursore e la formazione di idrossitriptofano (5-OH-triptofano) da parte della triptofano ossidrilasi (Figura 35.3); questo enzima non è inibito dal prodotto della reazione e la sua attività è modulata positivamente dalla stimolazione dei neuroni serotoninergici.

La triptofano ossidrilasi è inoltre importante perché catalizza la prima tappa della sintesi della melatonina, il neurotrasmettitore della ghiandola pineale, che gioca un ruolo chiave nella regolazione del ciclo sonno veglia (vedi **CD**: Approfondimento 35.3. *Melatonina, 5-HT e regolazione dei ritmi circadiani*). Sono state descritte molte isoforme di questo enzima, alcune potenzialmente connesse con una predisposizione al suicidio.

Il 5-OH-triptofano può essere somministrato come farmaco esogeno e trasformato in 5-HT. L'efficienza del 5-OH-triptofano è superiore rispetto all'amminoacido non modificato, probabilmente in quanto esso non viene utilizzato in altri processi metabolici o per la sintesi proteica. Il 5-OH-triptofano è quindi decarbossilato a 5-idrossitriptamina (5-HT) da una decarbossilasi degli amminoacidi aromatici (Figura 35.3). La triptofano ossidrilasi e la sintesi di 5-HT possono essere bloccate in modo duraturo dalla p-clorofenilalanina, farmaco di esclusivo interesse sperimentale. In genere i farmaci che interferiscono con la sintesi di 5-HT sono utili nella manipolazione di modelli sperimentali, ma sono di scarso interesse clinico.

■ La 5-HT è metabolizzata dalle MAO

La via catabolica principale della 5-HT prevede la sua ossidazione a 5-idrossi-3-indolacetaldeide da parte di MAO-A, localizzata in parte sui mitocondri all'interno delle terminazioni nervose (Figura 35.3 e punto 11 in Figura 35.4); l'aldeide è immediatamente trasformata in 5-HIAA da parte di aldeide deidrogenasi; l'accumulo di 5-HIAA nel liquido cerebrospinale è indice del turnover della 5-HT. Circa 1/3 dei metaboliti urinari della 5-HT sono dovuti a trasformazione del neurotrasmettitore in O-solfato per opera di una sulfotrasferasi.

■ Accumulo intravescicolare di 5-HT

Nei neuroni la 5-HT neosintetizzata (o ricaptata dal trasportatore di membrana) viene concentrata in vescicole presenti nelle terminazioni sinaptiche (punto 5 in Figura 35.4) da un trasportatore simile a quello che trasferisce noradrenalina e dopamina nelle vescicole dei rispettivi neuroni. L'alcaloide naturale reserpina e la tetrabenazina inattivano il trasportatore vescicolare e provocano deplezione di 5-HT, noradrenalina e dopamina nelle rispettive terminazioni sinaptiche. L'azione della reserpina è di lunga durata a causa del legame scarsamente reversibile

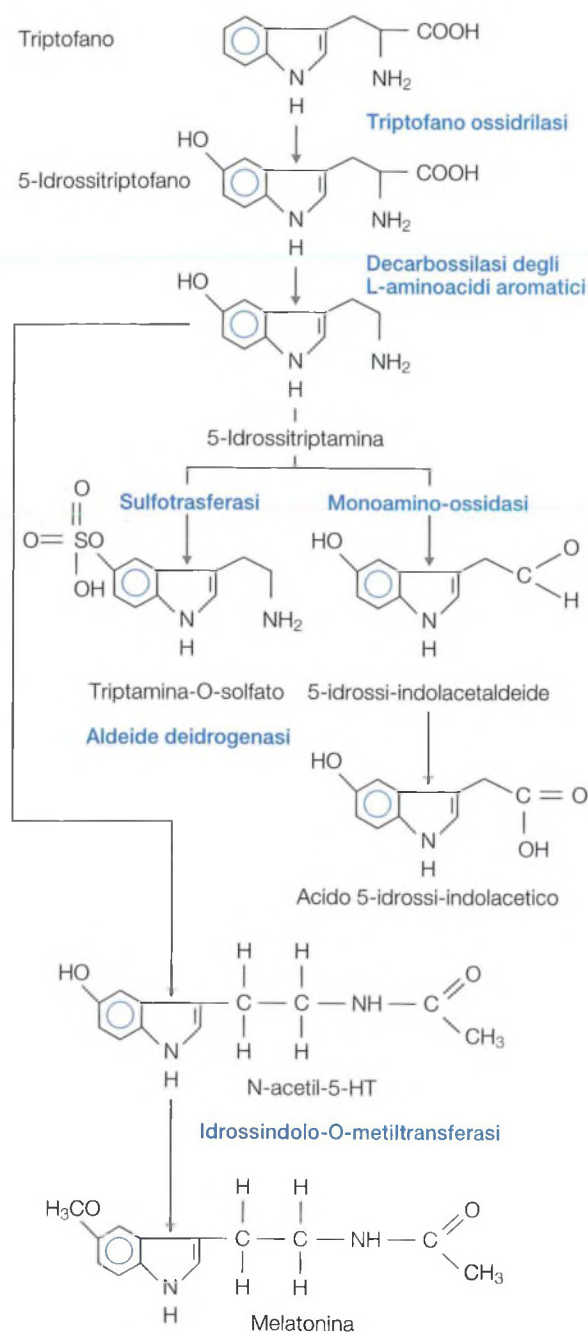


FIGURA 35.3 Sintesi della 5-idrossitriptamina.

che l'alcaloide forma con il trasportatore. La reserpina è stata usata come antipsicotico e antipertensivo, ma i suoi effetti collaterali, talora molto gravi e per lo più dovuti alla mancanza di selettività nei confronti delle ammine biogene, hanno giustamente fatto della reserpina un farmaco dall'illustre passato, peraltro tuttora valido come strumento di ricerca.

Liberazione di 5-HT e inattivazione del segnale serotoninergico

La liberazione fisiologica della 5-HT dalle terminazioni nervose avviene per esocitosi calcio-dipendente di vescicole presinaptiche. La liberazione esocitotica di 5-HT può essere modulata positivamente o negativamente da sostanze diverse (spesso neurotrasmettitori provenienti da neuroni circostanti) che attivano recettori presinaptici non serotoninergici (eterorecettori presinaptici, Figura 35.4, punto 16) situati sulle terminazioni sinaptiche che liberano 5-HT. È stata ad esempio riportata l'esistenza di eterorecettori colinergici muscarinici, GABAergici e α_2 -adrenergici localizzati sulle terminazioni sinaptiche serotoninergiche. Anche i recettori presinaptici serotoninergici (autorecettori) modulano il rilascio di serotonina (Figura 35.4, punto 16). Il recettore 5-HT_{1D} inibisce la liberazione di serotonina nella sostanza nera e nei gangli della base; l'autorecettore somatodendritico 5-HT_{1A} diminuisce invece il firing dei neuroni serotoninergici del rafe. Questi recettori presinaptici rappresentano potenziali bersagli per nuovi farmaci in grado di modulare la trasmissione serotoninergica.

■ L'inattivazione del segnale serotoninergico avviene per ricaptazione della 5-HT

La concentrazione del neurotrasmettitore liberato nello spazio sinaptico si riduce per l'intervento di due processi: a) diluizione negli spazi extracellulari e passaggio nei vasi sanguigni; b) ricaptazione da parte delle terminazioni a opera di un trasportatore specifico di membrana.

Il trasportatore appartiene alla superfamiglia genica di cui sono membri i trasportatori per i neurotrasmettitori aminergici (vedi Capitolo 24). Il legame con la 5-HT avviene nello spessore della membrana cellulare, in una sorta di tasca formata dai tratti idrofobici e l'affinità sul sito di legame è modulata da Na^+ e Cl^- , che sono cotrasportati all'interno della cellula. La V_{max} del trasportatore può essere modulata dalla fosforilazione da parte della proteinchinasi A. In seguito all'attivazione il trasportatore può essere internalizzato e la cellula regola attraverso questa via il suo numero di trasportatori alla superficie cellulare. Il trasportatore è in grado sia di ricapturare che di estrarre 5-HT (punti 10 e 13 di Figura 35.4), fenomeno che è alla base del meccanismo d'azione dei farmaci agonisti indiretti. Molti studi recenti di genetica psichiatrica hanno dimostrato che una variante genica del trasportatore per 5-HT costituisce un fattore di vulnerabilità per alcune malattie psichiatriche e regola la risposta al trattamento con SSRI (vedi Capitolo 24).

Alcuni anoressizzanti e sostanze d'abuso sono agonisti 5-HT indiretti

Alcuni farmaci ad azione indiretta come l'amfetamina e analoghe sostanze di abuso come la metilenediossimetamfetamina causano liberazione di 5-HT dalle terminazioni sinaptiche. Il rilascio avviene tramite il trasportatore situato nella membrana plasmatica della terminazione normalmente adibita al recupero del mediatore, ma che in certe condizioni può funzionare a ritroso (vedi Capitolo 24).

La metamfetamina metilendiossido è una sostanza da abuso nota col nome di *ecstasy*. La droga provoca una massiccia liberazione di dopamina e di 5-HT. Nei roditori si osserva inoltre un impressionante effetto neurotossico ritardato (che compare anche alcuni mesi dopo la somministrazione di *ecstasy*) a carico dei neuroni serotoninergici, effetto che può essere prevenuto

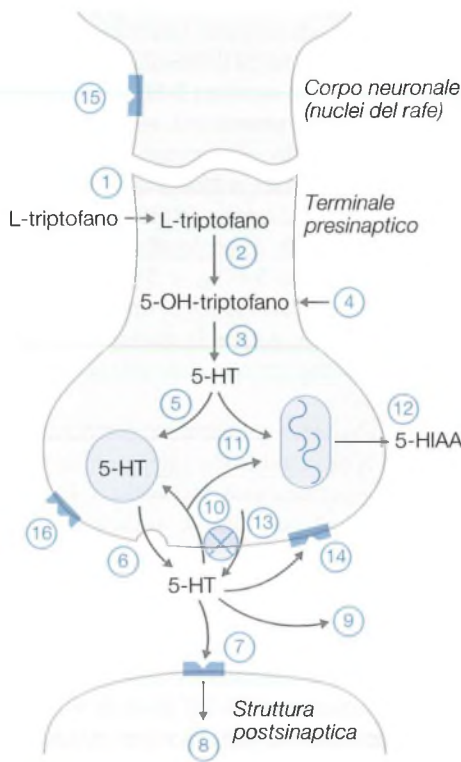


FIGURA 35.4 Neurone serotoninergico e suoi possibili bersagli farmacologici. 1. Captazione di L-triptofano; 2. ossidrilazione di L-triptofano a 5-OH-triptofano (inibita da p-clorofenilalanina); 3. decarbossilazione di 5-OH-triptofano a 5-HT; 4. captazione di 5-OH-triptofano; 5. incorporazione di 5-HT nella vescicola sinaptica (inibita da reserpina e tetrabenazina); 6. liberazione di 5-HT per esocitosi; 7. interazione con recettori postsinaptici; 8. sistemi di trasduzione recettoriale; 9. allontanamento dal recettore e passaggio nei vasi sanguigni; 10. ricaptazione nella terminazione sinaptica mediata dal trasportatore (inibita da fluoxetina, clorimipramina, fluvoxamina ecc.); 11. deaminazione ossidativa a opera delle MAO (inibita da moclobemide); 12. eliminazione del prodotto deaminato 5-HIAA; 13. liberazione mediata da trasportatore (bloccata da inibitori della ricaptazione, vedi punto 10); 14. autorecettore presinaptico e (15) somato-dendritico (attivato da agonisti 5-HT_{1A} come gepirone, buspirone e ipsapirone); 16. eterorecettori presinaptici per neurotrasmettitori diversi.

dalla somministrazione di bloccanti della ricaptazione della 5-HT. Recenti esperimenti hanno mostrato che la somministrazione di *ecstasy* a primati (scimmie) per soli quattro giorni induce degenerazione e scomparsa di fibre serotoninergiche in corteccia e aree limbiche del cervello, suggerendo danni profondi ai neuroni serotoninergici. Queste lesioni sono presenti fino a sette anni dopo la somministrazione.

Alcune classi di farmaci antidepressivi inibiscono la ricaptazione della 5-HT

Farmaci antidepressivi triciclici e non triciclici, legandosi reversibilmente a un sito presente sul versante extracellulare del trasportatore, inibiscono la ricaptazione di 5-HT. In realtà molti degli antidepressivi triciclici (amitriptilina, imipramina, nortriptilina) sono in grado di inibire anche l'attività dei trasportatori di altre monoamine. Gli SSRI (fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, paroxetina, citalopram ed escitalopram) sono antidepressivi non triciclici dotati invece di selettività, variabile a seconda del farmaco, per il trasportatore della serotonina. Tutti questi farmaci sono utilizzati nella terapia dei disturbi dell'umore e di ansia e di altre malattie psichiatriche (vedi CD: Approfondimento 35.1).

Classificazione dei recettori serotoninergici

La dimostrazione definitiva dell'esistenza di almeno due tipi di recettori serotoninergici fu ottenuta da Gaddum e Picarelli nel 1957, sebbene il primo lavoro a ipotizzare l'esistenza di sottotipi recettoriali fosse stato pubblicato da Gaddum e Hameed già nel 1954. A partire da allora numerosi studi hanno portato all'identificazione di sette famiglie recettoriali con almeno 14 diversi sottotipi, caratterizzati da specifiche proprietà strutturali, biochimiche o farmacologiche (Tabella 35.1).

La famiglia dei recettori 5-HT₁ comprende i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}. Essi presentano un'omologia di sequenza del 40-60%, sono preferibilmente accoppiati a proteine G_{1/0} e la loro attivazione determina una riduzione dei livelli intracellulari di cAMP. I sottotipi recettoriali 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} sono specie omologhe, caratteristiche rispettivamente dei roditori e dell'uomo, con diverse proprietà farmacologiche che hanno la funzione di limitare il rilascio di 5-HT e altri trasmettitori da terminazioni sinaptiche.

La famiglia 5-HT₂ è costituita dai tre sottotipi 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}. L'omologia di sequenza di questi recettori è del 45-50% e sono recettori accoppiati a proteine G_{q/11} la cui attivazione induce un aumento dei livelli di IP3 e del rilascio intracellulare dello ione calcio (vedi Capitolo 9). I recettori 5-HT₃ sono recettori canale pentamerici operati da ligando, strutturalmente simili ai recettori nicotinici per l'acetilcolina. Tale famiglia comprende le isoforme 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, 5-HT_{3E} e 5-HT_{3EA}. Inoltre la subunità 5-HT_{3A}, tramite splicing alternativo, può dare origine ad almeno quattro diverse isoforme (5-HT_{3A(a)}, 5-HT_{3A(b)}, 5-HT_{3AT} e 5-HT_{3AL}). I recettori 5-HT₃ sono localizzati su neuroni centrali e periferici do-

ve inducono rapida depolarizzazione tramite influsso di ioni sodio e calcio ed efflusso di potassio. Evidenze sperimentali hanno mostrato che i recettori funzionali sono eteromeri tutti contenenti subunità 5-HT_{3A} (5-HT_{3A/3B}, 5-HT_{3A/3C}, 5-HT_{3A/3D}, 5-HT_{3A/3E} e 5-HT_{3A/3Ea}).

La famiglia dei recettori 5-HT₄ è costituita dalle isoforme 5-HT_{4A}, 5-HT_{4B}, 5-HT_{4C}, 5-HT_{4D}, 5-HT_{4E}, 5-HT_{4F}, 5-HT_{4G}, 5-HT_{4H} e 5-HT_{3HBa}. Si tratta di recettori accoppiati a proteine G_s e, tramite modulazione positiva di adenilato ciclasi, portano a un aumento dei livelli di cAMP. Le isoforme 5-HT_{5A} e 5-HT_{5B} della famiglia 5-HT₅ presentano un'omologia di sequenza del 70-80% e la loro attivazione determina, tramite accoppiamento a proteine G_{i/o}, una riduzione dei livelli intracellulari di cAMP.

I recettori delle famiglie 5-HT₆ e 5-HT₇ (5-HT_{7A}, 5-HT_{7B}, 5-HT_{7C} e 5-HT_{7D}) sono tutti accoppiati a proteine G_s e quindi, tramite attivazione di adenilato ciclasi, aumentano i livelli intracellulari di cAMP.

Data la continua evoluzione dell'argomento, lo studioso è invitato a un continuo aggiornamento.

Farmaci attivi sui recettori serotoninergici

La farmacologia dei recettori serotoninergici è in continua evoluzione. Per alcune isoforme recettoriali sono stati sviluppati agonisti e antagonisti selettivi (Tabella 35.2), alcuni dei quali hanno mostrato proprietà farmacologiche utili in campo clinico. Tuttavia, la maggior parte dei farmaci attivi sul sistema serotoninergico è caratterizzata da un profilo recettoriale misto (Tabella 35.3). Nonostante 5-HT sia particolarmente importante nella regolazione della funzione cardiovascolare, fatta eccezione per la chetanserina (Tabella 35.3), non vi sono sul mercato farmaci serotoninergici per patologie cardiovascolari. Tra i motivi di questa mancanza si annovera la complessità della regolazione serotoninergica, espletata attraverso almeno 14 diversi sottotipi recettoriali e non ancora interamente conosciuta, nonché la mancanza per alcuni di questi recettori di ligandi altamente selettivi.

Alcuni farmaci ansiolitici sono agonisti parziali dei recettori 5-HT_{1A}

I recettori 5-HT_{1A} funzionano da autorecettori somatodendritici nel rafe, da cui origina la maggior parte delle vie serotoninergiche del SNC. L'attivazione degli autorecettori causa una riduzione della frequenza di scarica dei nuclei del rafe. Sembra che la conseguente inibizione serotoninergica sia responsabile degli effetti ansiolitici di alcuni agonisti parziali dei recettori 5-HT_{1A} (buspirone, gepirone, ipsapirone) e dei loro effetti collaterali. La stimolazione dei recettori 5-HT_{1A} induce infatti iperfagia e ipotermia. Inoltre questi recettori hanno un ruolo importante nella modulazione delle funzioni cognitive e nei sintomi negativi della schizofrenia: alcuni antipsicotici atipici (aripirazolo, clozapina, quetiapina, olanzapina) sono agonisti parziali 5-HT_{1A}. Infine, sono attualmente in sviluppo agonisti recettoriali per la terapia dei disturbi

cognitivi legati all'Alzheimer e molecole con potenziale attività antidepressiva.

Farmaci agonisti dei recettori 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F} sono antiemicranici

Si ritiene che l'efficacia terapeutica nel trattamento dell'emicrania acuta dei triptani (rizatriptan, sumatriptan, zolmitriptan), agonisti 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F} sia dovuta ad attivazione di questi recettori a livello delle fibre sensitive del trigemino associate ai grossi vasi meningei. Ciò inibirebbe la liberazione di sostanze vasodilatatorie (neuropeptidi, come il CGRP, o l'ossido nitrico), considerate responsabili dell'insorgenza degli attacchi di emicrania (vedi CD: Approfondimento 35.2).

Farmaci attivi sui recettori 5-HT₂

Si ritiene che i recettori 5-HT_{2A} controllino le risposte biochimiche e comportamentali alle sostanze d'abuso. Ad esempio, LSD, un potente allucinogeno, sebbene agisca su un gran numero di recettori (serotonergici, dopaminergici, adrenergici), esercita il suo effetto principalmente mediante agonismo sui recettori 5-HT_{2A}. Inoltre, diversi antipsicotici tipici (clorpromazina, aloperidolo) e atipici (risperidone, sertindolo, clozapina, olanzapina, quetiapina) e alcuni farmaci antidepressivi (mirtazapina, fluoxetina, agomelatina) hanno un'azione antagonista sui recettori 5-HT₂ (vedi CD: Approfondimento 35.1). Ritanserina è un antagonista 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} utilizzato in terapia combinata con antipsicotici tipici per ridurre gli effetti extrapiramidali. Anche la metisergide, utilizzata nella terapia dell'emicrania, a dosi terapeutiche blocca i recettori 5-HT₂.

I recettori 5-HT_{2A} sono ampiamente distribuiti anche a livello periferico, dove inducono aggregazione piastrinica e aumento della permeabilità dei capillari. L'antagonista 5-HT_{2A} selettivo sarpogrelate è utilizzato in clinica come agente antiaggregante per il trattamento dell'arteriosclerosi. La chetanserina è un farmaco la cui attività antipertensiva è stata considerata per anni mediata da attività antagonista selettiva per recettori 5-HT_{2A} presenti nei nuclei vasomotori bulbari. In realtà la chetanserina agisce da antagonista sia di 5-HT_{2A} sia di 5-HT_{2C} e mostra elevata affinità anche per i recettori α_1 -adrenergici e i recettori istaminici H₁.

I farmaci antagonisti sui recettori 5-HT₃ sono antiemetici privi di effetti extrapiramidali e potenziali antipsicotici

I recettori 5-HT₃ sono particolarmente concentrati in aree del cervello implicate nel riflesso del vomito (nucleo del tratto solitario e area postrema). I setroni, antagonisti recettoriali selettivi (ondansetron, granisetron) sono utilizzati nel trattamento del vomito incoercibile indotto da alcuni farmaci chemioterapici. I setroni non sono antagonisti di recettori dopaminergici e i recettori 5-HT₃ non sono espressi nel sistema nigro-striatale. Pertanto, a differenza dei classici antiemetici antidopaminergici (come la metoclopramide), questi farmaci non inducono disturbi di tipo extrapiramidale.

TABELLA 35.2 Agonisti e antagonisti selettivi dei recettori serotoninergici

Nome	Agonisti selettivi	Antagonisti selettivi
5-HT _{1A}	8-OH-DPAT 8-OH-PIPAT pironi (agonisti parziali)	p-MPPF p-MPPI WAY 100635 WAY 101405
5-HT _{1B}	CP 93129 CP 94253 GR 46611	SB 216641 SB 224289 GR 55562 (potente antagonista 5-HT _{1B} e 5-HT _{1D})
5-HT _{1D}	PNU 109291 PNU 142633	LY 310762 BRL 15572
5-HT _{1E}	BRL 54443 (agonista 5-HT _{1E} e 5-HT _{1F})	—
5-HT _{1F}	LY 334370 LY 344864 BRL 54443 (agonista 5-HT _{1E} e 5-HT _{1F})	—
5-HT _{2A}	DOI DOB DOM	4F 4PP M 100907 R 96544 Sarpogrelate
5-HT _{2B}	α-Me-5-HT BW 723C86	LY 272015 RS 127445 SB 204741
5-HT _{2C}	MK 212 Ro 60-0175 CP 809191 WAY 163909	RS 102221 SB 242084 Lorcaserina
5-HT ₃	SR 57227 MD-354 RS 56812	Bemesetron, dolasetron, granisetron, itasetron, ondansetron, zotasetron
5-HT ₄	Benzamidi (saprindi) Benzimidazoloni	GR 113808 GR 125487 RS 67532
5-HT ₅	—	SB 699551
5-HT ₆	E-6801 WAY 181187 WAY 208466	Ro 04-6790 SB 258585 SB 399885
5-HT ₇	AS 19 LP 12 LP 44	SB 258719 SB 2699710

Infine, l'attivazione del recettore 5-HT₃ facilita la liberazione di diversi neurotrasmettitori tra cui la dopamina. Antagonisti selettivi di questi recettori sono perciò potenziali neurolettici privi di effetti extrapiramidali.

Farmaci agonisti dei recettori 5-HT₄ modulano la peristalsi intestinale

I recettori 5-HT₄ sono localizzati a livello del tratto gastrointestinale e nel cuore, dove regolano rispettivamente l'attività peristaltica e la forza di contrazione delle fibre atriali cardiache. Alcuni agonisti completi (benzamidi: cisapride, mosapride) e parziali (tegaserod) sono stati utilizzati per il trattamento delle patologie gastrointestinali. Tuttavia, a oggi sono stati ritirati dal mercato a causa dei loro effetti collaterali, specialmente a carico del sistema cardiovascolare. L'unica benzamide attualmente utilizzata per la terapia della costipazione è la proclorpride a causa dei suoi minori effetti collaterali.

I recettori 5-HT₄ sono ampiamente distribuiti anche a livello centrale dove sembra svolgano un ruolo nei processi

TABELLA 35.3 Farmaci attivi sul sistema serotoninergico

Farmaci	Patologia	Meccanismo d'azione
Buspirone Gepirone Ipsapirone	Ansia	Agonisti parziali 5-HT _{1A}
Sumatriptan Zolmitriptan Rizatriptan Naratriptan Almotriptan Eletriptan Frovatriptan	Emicrania	Agonisti 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} , 5-HT _{1E} , 5-HT _{1F}
Ritanserina	Disturbi extrapiramidali	Antagonista 5-HT _{2A} e HT _{2C}
Metisergide	Emicrania	Antagonista 5-HT ₂
Sarpogrelate	Arteriosclerosi	Antagonista 5-HT _{2A}
Chetanserina	Iperensione	Antagonista 5-HT _{2A} e 5-HT _{2C} , α ₁ -adrenergico, istaminico H ₁
Dolasetron Granisetron Ondansetron Palonosetron Tropisetron Zotasetron	Vomito indotto da chemioterapici	Antagonisti 5-HT ₃
Proclorpride	Stipsi	Agonista 5-HT ₄
Antipsicotici tipici (clorpromazina, aloperidolo)	Schizofrenia	Antagonisti D ₂ , D ₃ , 5-HT _{2A} , 5-HT _{1A}
Antipsicotici atipici (aripirazolo, clozapina, quetiapina, olanzapina, risperidone, sertindolo, ziprasidone)	Schizofrenia	Profilo recettoriale misto (recettori dopaminergici, serotoninergici, istaminergici, adrenergici)
Mirtazapina	Depressione	Antagonista recettore α ₂ -adrenergico, 5-HT ₂ , 5-HT ₃ , 5-HT ₇
Fluoxetina Sertralina Citalopram Escitalopram Fluvoxamina Paroxetina	Depressione	Inibitori selettivi della ricaptazione di 5-HT
Agomelatina	Depressione	Agonista melatonergico MT ₁ e MT ₂ , antagonista 5-HT _{2C}
Clomipramina	Depressione	Inibitore della ricaptazione di 5-HT, noradrenalina, dopamina; antagonista 5-HT _{2A} , 5-HT _{2C} , 5-HT ₃ , 5-HT ₆ , 5-HT ₇ , dopaminergico, α ₁ -adrenergico e istaminico H ₁
Amitriptilina	Depressione	Inibitore della ricaptazione di 5-HT e noradrenalina; antagonista 5-HT _{2A} , 5-HT _{2C} , 5-HT ₆ , 5-HT ₇ , α ₁ -adrenergico e istaminico H ₁
Nortriptilina	Depressione	Inibitore della ricaptazione di noradrenalina e 5-HT; antagonista istaminico H ₁ , 5-HT ₂ e α ₁ -adrenergico
Amisulpride	Depressione	Antagonista dopaminergico e HT ₇

di apprendimento e memoria e nel controllo dell'umore e dell'appetito. Queste proprietà ne fanno potenziali bersagli per lo sviluppo di farmaci agonisti per la terapia del morbo di Alzheimer e della depressione e di antagonisti per la cura dell'anoressia nervosa.

Farmaci antagonisti dei recettori 5-HT₆ sono in studio per la terapia dell'Alzheimer

Gli antagonisti selettivi dei recettori 5-HT₆, sebbene non siano localizzati sui neuroni colinergici, aumentano la trasmissione colinergica e regolano positivamente i processi di apprendimento e memoria. Per questo motivo sono attualmente in studio per la terapia dei disturbi cognitivi nella malattia di Alzheimer e sono stati proposti anche come potenziali antipsicotici e antidepressivi. D'altra parte, alcuni antipsicotici (clozapina, olanzapina) e antidepressivi (clomipramina, amitriptilina, nortriptilina) mostrano anche un'attività antagonista sui recettori

5-HT₆. Infine, una molecola antagonista 5-HT₆ è in studio per la terapia dell'obesità.

Farmaci antagonisti dei recettori 5-HT₇ sono potenziali antidepressivi

I recettori 5-HT₇ sono stati identificati solo all'inizio degli anni 90 ed è stato dimostrato un loro ruolo nella regolazione dei ritmi circadiani, della termoregolazione e dei processi di apprendimento e memoria e forse anche nelle patologie psichiatriche e neurologiche e soprattutto nella patologia depressiva. Infatti, se da un lato, molti farmaci antidepressivi (sia triciclici, sia inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina) svolgono un'azione antagonista sui recettori 5-HT₇, dall'altro, l'inibizione di tale recettore potenzia l'effetto degli antidepressivi. Inoltre è stato dimostrato che l'efficacia antidepressiva dell'amisulpride passa primariamente attraverso un'azione antagonista sui recettori 5-HT₇.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ La serotonina modula importanti processi psicobiologici legati al comportamento, inclusi l'umore, l'aggressività, la percezione, l'attenzione, la gratificazione, la memoria, l'appetito, la sessualità.
- ▶ Il ruolo periferico della serotonina si esplica a livello del sistema cardiovascolare, dell'apparato gastrointestinale, del sistema genitourinario, del metabolismo e del sistema endocrino; della nocicezione.
- ▶ La serotonina è sintetizzata a partire dall'amminoacido L-triptofano, è immagazzinata in vescicole e viene rilasciata dalle terminazioni nervose per escitosi calcio-dipendente.
- ▶ I livelli sinaptici della serotonina sono regolati da diluizione negli spazi extracellulari, passaggio nei vasi sanguigni e ricaptazione da parte di un trasportatore specifico di membrana.
- ▶ La via catabolica principale della serotonina prevede la sua ossidazione da parte di MAO-A mitocondriali.
- ▶ Sono state identificate sette famiglie di recettori serotoninergici con almeno 14 diversi sottotipi.
- ▶ I farmaci serotoninergici sono attivi soprattutto nelle patologie del SNC.

Bibliografia essenziale

- ▶ Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009;60:355-66.
- ▶ Caspi A, Hariri AR, Holmes A et al. Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry* 2010;167:509-27.
- ▶ Filip M, Bader M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep* 2009;61:761-77.
- ▶ Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 2008;195:198-213.
- ▶ Harmar AJ, Hills RA, Rosser EM et al. IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucl Acids Res* 37 (Database issue)2009:D680-D5.
- ▶ Jonnakuty C, Gragnoli C. What do we know about serotonin? *J Cell Physiol* 2008;217:301-6.
- ▶ Millan M, Marin P, Bockaert J, Mannoury la Cour C. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Tr Pharmacol Sci* 2008;29:454-64.
- ▶ Racagni G, Popoli M. The pharmacological properties of antidepressants. *Int Clin Psychopharmacol* 2010;25:117-31.
- ▶ Villalon CM, Centurion D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptor/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 2007;376:45-63.

La trasmissione istaminergica

Emanuela Masini

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le conoscenze di base sulla sintesi e sul metabolismo dell'istamina, sulla distribuzione e sulle funzioni dei recettori istaminergici
- ▶ Acquisire conoscenze teoriche e pratiche sulle azioni dell'istamina a livello dei vari organi e apparati
- ▶ Acquisire conoscenze sulle funzioni dell'istamina endogena
- ▶ Acquisire conoscenze sulle azioni molecolari dell'istamina: interazioni dell'istamina con i suoi recettori e trasduzione del segnale a livello cellulare
- ▶ Acquisire conoscenze teoriche e pratiche sui farmaci attivi sui diversi recettori istaminergici e i loro usi terapeutici e sviluppi futuri

L'istamina è tra i primi mediatori scoperti all'inizio del secolo: fu sintetizzata per decarbossilazione dell'amminoacido istidina, come curiosità chimica nel 1907 da Windaus e Vogt prima della sua identificazione in natura. Nel 1910 Barger e Dale la isolarono da un estratto di segale cornuta e le ricerche di Sir Henry Dale evidenziarono la presenza dell'istamina nella mucosa intestinale e in molti tessuti animali e dimostrarono i suoi effetti fisiopatologici.

Il termine istamina (dal greco *ιστός*: tessuto) apparve per la prima volta nel 1912 in alcuni articoli di Fuhner, Frolich e Pick. Chimicamente l'istamina è il 5-(2-aminoetil)imidazolo o β -imidazoliethylamina. La catena etilaminica è presente anche in altri neurotrasmettitori di tipo amminico, ad esempio nella dopamina, nella norepinefrina e nella serotonina. Il nucleo imidazolico, assente negli altri neurotrasmettitori conferisce all'istamina proprietà

chimiche distinte; tra queste il tipico tautomerismo, una proprietà che permette all'istamina di essere presente in due differenti forme.

Le proprietà tautomeriche dell'istamina sono importanti per l'attivazione dei diversi recettori. A pH fisiologico si trova prevalentemente in forma cationica, con l'ammino gruppo terminale della catena laterale carico positivamente (Figura 36.1). Modificazioni della struttura chimica, sia nell'anello imidazolico che nella struttura etilaminica, modificano l'affinità recettoriale e quindi la conseguente risposta biologica.

Le molteplici attività biologiche dell'istamina sono attribuite all'interazione con quattro recettori, denominati H_1 , H_2 , H_3 e H_4 . Questi recettori sono accoppiati a proteine G e trasducono il segnale extracellulare attraverso, rispettivamente, Gq, Gs e Gi/o.

Distribuzione e funzioni del sistema istaminergico

La presenza dell'istamina è stata documentata in invertebrati e vertebrati, in batteri e in piante. È presente in quasi tutti i tessuti dei mammiferi. È particolarmente concentrata nei mastociti (10-20 pg/cellula) e, a livello gastrico, anche nelle cellule *EnteroChromaffin-Like* (ECL). L'istamina è contenuta in granuli citoplasmatici metacromatici, non dissimili da quelli mastocitari ma di dimensioni più piccole, legata alla matrice proteica dei granuli da cui viene

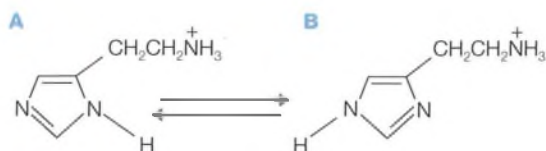


FIGURA 36.1 Struttura chimica dell'istamina che illustra le due forme tautomeriche. L'anello imidazolico presenta due atomi di N, per la protonazione, la forma chimica con un solo protone può esistere su due forme tautomeriche: N¹-istamina (A) e N³-istamina (B).

rapidamente liberata dallo stimolo colinergico e dalla gastrina, raggiungendo attraverso un trasporto capillare le cellule parietali dove stimola la secrezione cloro-peptica gastrica.

I mastociti, il cui nome deriva da Mast Zellen, in quanto si pensava che i numerosi granuli metacromatici in cui l'istamina è contenuta sotto forma di un complesso con l'eparina, fossero la conseguenza di un processo di ipernutrizione cellulare, sono presenti in tutti gli organi ricchi in tessuto connettivo: nella cute, negli organi linfatici, nel midollo osseo, nelle sierose, a livello della sottomucosa del tratto gastrointestinale e respiratorio e nel sistema nervoso centrale (SNC). Hanno localizzazione perivascolare e connessione con le terminazioni nervose. Nel sangue, l'ammina è contenuta in quantità significative nei granulociti basofili dell'uomo (0,5-1 pg per cellula); nelle piastrine del coniglio e negli eosinofili del cane. L'istamina è contenuta nei neuroni intramurali della parete gastrica, nel plesso mioenterico, nel duodeno prossimale e anche nello stomaco.

L'istamina nel cervello è localizzata in neuroni e modula la secrezione dei neurotrasmettitori

L'istamina è presente nel cervello alle concentrazioni di 0,5 nmol/g di tessuto, ha una distribuzione regionale non uniforme. Nell'uomo l'ipotalamo ha il contenuto più alto, ma quantità significative dell'ammina sono presenti nello striato, nel bulbo olfattorio, nella substantia nigra, nel talamo e nell'ippocampo. Sistemi enzimatici specifici consentono la sintesi e il catabolismo dell'istamina cerebrale e la loro distribuzione è simile a quella dell'istamina endogena. L'istamina penetra scarsamente la barriera ematoliquorale, e deve perciò essere sintetizzata localmente; pertanto, in buona parte, l'istamina cerebrale è localizzata, nelle terminazioni sinaptiche, assieme alla L-istidino decarbossilasi (IDC), enzima deputato alla sua sintesi. Studi effettuati negli animali da laboratorio con l' α -fluorometilistidina, un analogo dell'istidina che inibisce l'IDC, ma non altre decarbossilasi, come la DOPA e la glutammato decarbossilasi, hanno evidenziato che esistono a livello cerebrale due pool dell'ammina: un pool neuronale, che viene rapidamente utilizzato e risintetizzato, e un pool non neuronale, prevalentemente mastocitario e vascolare, a emivita più lunga. I mastociti cerebrali hanno una localizzazione perivasale dove regolano il flusso sanguigno, la permeabilità vasale e/o la reattività immunologica. A livello della dura madre i mastociti sono localizzati in prossimità delle terminazioni sensitive e modulano la liberazione di mediatori dell'infiammazione. I mastociti cerebrali sembrano coinvolti in patologie neurodegenerative, come la sclerosi multipla, la malattia di Alzheimer o l'encefalopatia di Wernicke. Il ruolo dell'istamina cerebrale è stato, per molti anni, accreditato solo per gli effetti sedativi e oressigeni dei classici antistaminici H_1 e di numerosi farmaci usati in neuropsichiatria, come gli antipsicotici tipici e atipici e gli antidepressivi. Questi effetti collaterali erano dovuti al blocco dei recettori istaminergici H_1 , che sono cruciali nella regolazione del ciclo sonno/veglia e nell'assunzione

di cibo. Nonostante questa evidenza, molti antistaminici anti- H_1 usati in clinica, non hanno trovato uso per la terapia del sonno, per la loro lunga emivita e per gli effetti collaterali. Agonisti istaminergici H_1 non sono in uso terapeutico per l'ipersonnia e i disturbi di assunzione del cibo, in quanto non sono disponibili composti sufficientemente permeabili la barriera emato-encefalica e privi di effetti collaterali periferici. Il ruolo fisiopatologico dell'istamina cerebrale è stato finalmente riconosciuto all'inizio degli anni 80, quando, contemporaneamente alla scoperta del recettore istaminergico H_3 , un autorecettore che controlla l'attività dei neuroni istaminergici, furono disponibili anticorpi per l'istamina e per l'IDC. La presenza di neuroni istaminergici, che dalla formazione reticolare mesencefalica si proiettano alla corteccia cerebrale e dai corpi mammillari vanno allo striato, è stata evidenziata per mezzo di tecniche elettrofisiologiche e immunochimiche nei roditori e in tutte le altre specie animali studiate. Neuroni istaminergici sono stati evidenziati anche in frammenti autoptici umani nel nucleo tuberomammillare dell'ipotalamo basale posteriore e inviano proiezioni al setto e alla corteccia prefrontale dell'area preottica mediale.

Nel SNC l'istamina è considerata un neurotrasmettitore modulatore. I corpi cellulari bipolari o multipolari di diametro di 20-30 μm , sono confinati nel nucleo tuberomammillare in tutte le specie studiate; in tale nucleo si è anche dimostrata la presenza dell'RNA messaggero per l'enzima istidino decarbossilasi. Usando anticorpi fluorescenti verso l'istidino decarbossilasi e con metodi di marcatura retrograda, sono state identificate in vaste aree cerebrali numerose vie istaminergiche. La maggior densità è stata rilevata nell'ipotalamo, nel setto mediale, nell'area ventrale tegmentale. Una minore densità si osserva nella corteccia, nello striato, nell'ippocampo, nell'amigdala e nella substantia nigra. Una bassa concentrazione di fibre istaminergiche è stata rilevata nel talamo, nei nuclei del ponte e nella parte ventrale del setto (Figura 36.2).

L'istamina non penetra la barriera cerebrale, pertanto la sua sintesi a opera dell'enzima IDC è controllata dalla disponibilità di L-istidina. L'istamina neuronale è immagazzinata nei corpi cellulari dei neuroni e nelle varicosità degli assoni; la sintesi e il release dell'istamina sono controllati principalmente dai recettori istaminergici H_3 , autorecettori localizzati a livello del soma, dei dendriti e degli assoni delle cellule nervose.

L'istamina ha funzioni pre- e postsinaptiche

L'istamina agisce a livello postsinaptico per mezzo di tutti i suoi recettori (H_1 , H_2 , H_3 e H_4) ed è inattivata via metilazione dall'enzima N-metiltransferasi (NMT), e dalla diaminossidasi (DAO) che trasforma l'istamina in acido imidazolacetico, un metabolita con attività agonista per il recettore GABA_A. I neuroni istaminergici contengono anche gli enzimi deputati alla sintesi e al metabolismo di altri neurotrasmettitori classici, quali il GABA e l'adenosina; alcuni neuroni, inoltre, contengono la sostanza P, la galanina e la met-enkefalina. Sono state dimostrate connessioni sinaptiche, attraverso il sistema reticolare

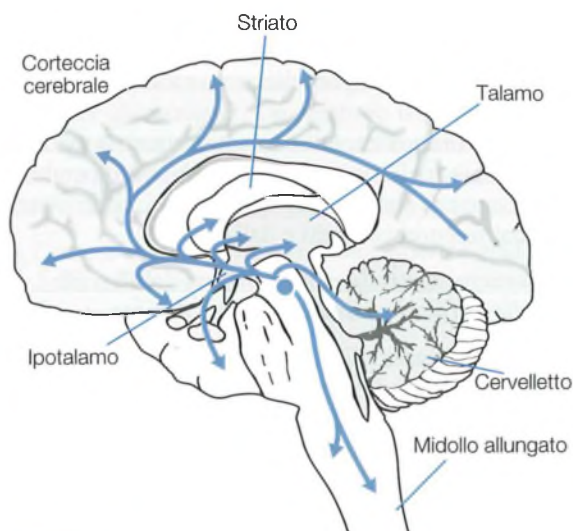


FIGURA 36.2 Rappresentazione schematica del sistema istaminergico nel cervello umano. Le frecce indicano le proiezioni delle fibre dai corpi cellulari.

ascendente, anche tra neuroni istaminergici e i corpi cellulari dei neuroni adrenergici e serotoninergici. Nella tabella 36.1 sono riportate le interazioni tra il sistema istaminergico e altri neurotrasmettitori.

L'istamina cerebrale può agire sia come neuromodulatore che come classico neurotrasmettitore. Il ruolo neuromodulatorio dell'istamina ha ricevuto notevole attenzione; in tal senso l'attivazione di un piccolo numero di cellule a livello del nucleo tuberomammillare determina liberazione di istamina che conseguentemente aumenta l'eccitabilità in cellule bersaglio ampiamente distribuite a livello cerebrale. La maggior parte dell'istamina secreta è non neuronale, e questo implica una sua ampia distribuzione. I neuroni istaminergici possono regolare ed essere regolati da altri neurotrasmettitori (Tabella 36.1). Il recettore istaminergico H_3 funziona come un eterorecettore inibitorio: la stimolazione di tale recettore a livello cerebrale inibisce la secrezione di acetilcolina, dopamina, norepinefrina, serotonina e di alcuni peptidi.

TABELLA 36.1 Effetti dell'istamina su altri neurotrasmettitori

Neurotrasmettitore	Effetto	Recettore coinvolto
Ach	↓ liberazione	H_3
Ach	↑ liberazione	H_2
CGRP	↓ liberazione	H_3
DA	↓ liberazione	H_3
GABA	↓ turnover	H_3
NE	↓ liberazione	H_3
NE	↑ liberazione	H_1
5-HT	↓ liberazione	H_3

Ach: acetilcolina; CGRP: Calcitonin Gene-Related-Peptide; GABA: acido γ -aminobutirrico; 5-HT: 5-idrossitriptamina
 ↑ Aumento; ↓ Diminuzione

La situazione è però complessa e l'istamina può avere effetti opposti su alcuni neurotrasmettitori a seconda che interagisca con i recettori H_1 e/o con gli H_2 .

L'azione dell'istamina si esplica attraverso l'attivazione di quattro tipi di recettori

Quattro recettori istaminergici ad azione metabotropa sono presenti nell'organismo e il significato funzionale dell'istamina varia a seconda della sede cellulare e del tipo di recettore (vedi paragrafo Recettori istaminergici e loro modulazione farmacologica; vedi CD: Approfondimento 36.1. I recettori istaminergici e le loro vie di trasduzione del segnale). Nella figura 36.3 sono illustrati i più importanti ruoli fisiologici dell'istamina.

L'istamina, come neurotrasmettitore, controlla molte funzioni del SNC

Essa è coinvolta nella regolazione dei meccanismi omeostatici ipotalamici: neuroni istaminergici nel nucleo tuberomammillare dell'ipotalamo posteriore e le loro proiezioni alla corteccia sono implicati nella regolazione dei meccanismi sonno-veglia mediata dai recettori H_1 . Topi transgenici per il recettore H_1 presentano deficit nel sistema locomotorio e nel comportamento esplorativo tipico di questa specie animale. L'istamina è coinvolta nel controllo delle emozioni e nei processi cognitivi, modulando la trasmissione colinergica: in pazienti deceduti per malattia di Alzheimer sono stati rilevati livelli di istamina nell'ipotalamo, nell'ippocampo e nella corteccia temporale significativamente più bassi di quelli rilevati in soggetti deceduti per altra patologia. L'istamina è anche implicata nella regolazione della temperatura corporea e delle funzioni neuroendocrine, modula infatti la secrezione di vasopressina, di ossitocina, di prolattina, dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e di β -endorfina, processi in cui i recettori istaminergici H_1 e H_2 sembrano coinvolti. Una riduzione del contenuto cerebrale di istamina, ottenuta mediante l'inibizione della sua sintesi a opera dell' α -fluorometilistidina, determina una inibizione dell'incremento di liberazione di ACTH, che si osserva nel ratto surrenectomizzato. Di recente, notevole attenzione è stata indirizzata al coinvolgimento dell'istamina nelle malattie autoimmuni e nella neuroinfiammazione. I recettori istaminergici H_4 , recentemente scoperti, presenti nelle cellule dendritiche, nei linfociti e nei mastociti, potrebbero essere coinvolti in importanti interazioni fisiopatologiche tra il sistema nervoso e quello immune. L'istamina controlla l'apporto di cibo e di acqua e la regolazione del peso corporeo: una elevata concentrazione dei recettori istaminergici è infatti presente a livello del nucleo ventromediale dell'ipotalamo, dove si pensa vi sia il centro per la sazietà, e la leptina, un fisiologico soppressore dell'appetito, agisce attraverso l'attivazione dei recettori istaminergici H_1 . Infatti, la ciproptadina, un antiserotoninergico con spiccate azioni antistaminiche, è usato da tempo come farmaco per stimolare l'appetito. Notevoli modificazioni del sistema istaminergico cerebrale sono state rilevate in patologie neurologiche come la sclerosi multipla, la malattia di Alzheimer, la sindrome

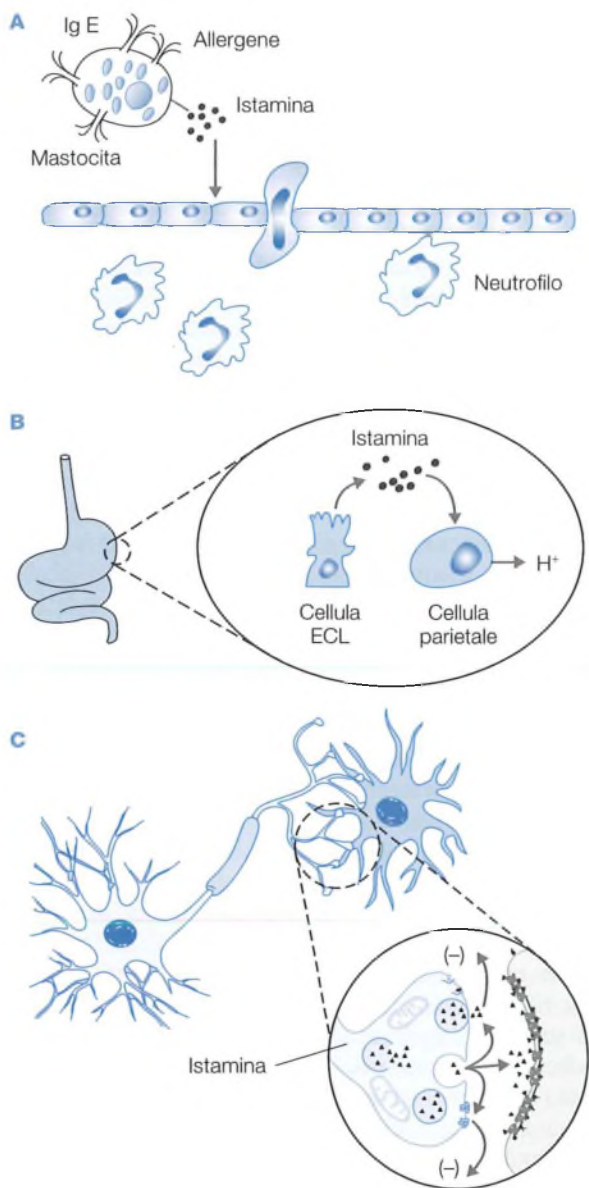


FIGURA 36.3 L'istamina è conosciuta da lungo tempo come mediatore dell'infiammazione (A); è secreta nello stomaco dalle ECL e agisce a livello delle cellule parietali stimolando la secrezione acida (B); è immagazzinata nei neuroni e opera da neurotrasmettitore a livello centrale e periferico (C).

di Down e l'encefalopatia di Wernicke; in alcuni casi sono presenti modificazioni sia nel numero che nella morfologia dei neuroni istaminergici. Sia l'istamina neuronale che quella mastocitaria possono essere implicate in tali patologie contribuendo a modificazioni della funzione vascolare, della barriera ematoencefalica e del sistema immunitario. Studi su colture cellulari di cellule ippocampali o su ovociti di *Xenopus* che esprimono la subunità NR2B e NR1 del recettore per l'*N*-metil-D-aspartato (NMDA) hanno evidenziato che l'istamina è in grado di potenziare la corrente indotta dall'attivazione del recettore NMDA e questo può spiegare alcuni suoi effetti neurotossici. Tuttavia in alcuni modelli di ischemia cerebrale l'istamina sembra esercitare

un'azione neuroprotettiva e stimolante i processi cognitivi. Per quanto riguarda le azioni elettrofisiologiche, l'istamina induce in prevalenza iperpolarizzazione con inizio lento e lunga durata.

Questi dati in apparenza discordanti mettono in evidenza la complessità dell'istamina nel cervello, che dipende dai diversi circuiti cerebrali sui quali agisce, dalle diverse aree, dai recettori coinvolti e dalle specie.

L'istamina controlla molte funzioni del sistema cardiovascolare, dal microcircolo al cuore

L'iniezione intradermica di istamina evoca la cosiddetta "triplice risposta di Lewis", che comprende eritema, edema locale e una zona di iperemia periferica che si manifesta più lentamente. L'effetto coinvolge tre diversi tipi di cellule: muscolo liscio del microcircolo, endotelio capillare e venulare e terminazioni nervose sensitive. Effetti locali analoghi possono essere prodotti iniettando dei liberatori di istamina nel derma o applicando un antigene alla cute di un soggetto sensibilizzato. La tipizzazione recettoriale della risposta vascolare all'istamina è complessa. I recettori istaminergici H₁ e H₂ contribuiscono a determinare gli effetti vascolari dell'istamina. L'istamina aumenta l'espressione delle molecole di adesione (P-selectina) a livello dell'endotelio facilitando il passaggio nei tessuti dei polimorfonucleati. Queste azioni sono mediate dall'attivazione dei recettori istaminergici H₁ e H₄. Queste funzioni dell'istamina sul microcircolo sono anche di rilevanza nella eziopatogenesi dei fenomeni infiammatori tissutali.

L'azione primaria dell'istamina sul cuore è caratterizzata oltre che da un aumento della frequenza e della contrattilità, da una diminuzione della velocità di conduzione atrio-ventricolare, da un aumento dell'automatismo e del flusso coronarico. La diminuzione del tono vasale, come pure l'aumento del flusso coronarico, determinati dall'istamina sono dovuti anche alla stimolazione della produzione di monossido di azoto (NO) da parte delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce, in prevalenza attraverso l'attivazione dei recettori istaminergici H₁, ma anche H₂. Molti degli effetti dell'istamina a livello cardiaco sono multifattoriali: una particolare risposta è spesso il risultato di componenti diverse mediate da recettori diversi e modulate da altri mediatori. Gli effetti cronotropo e inotropo positivi dell'istamina sembrano dovuti prevalentemente all'attivazione dei recettori istaminergici H₂. Le azioni sulla conduzione atrio-ventricolare, effetto dromotropo negativo, sono dovute all'attivazione di recettori H₁, quelle sul circolo coronarico coinvolgono entrambi i tipi di recettore.

L'istamina modifica l'aggregazione piastrinica e favorisce la riparazione tissutale

L'istamina ha anche un ruolo come mediatore intracellulare durante l'aggregazione piastrinica e nella riparazione tissutale. I contenuti di istamina aumentano dopo esposizione delle piastrine a stimoli aggreganti e nei tessuti in rapida crescita; tale effetto è prevenuto dall' α -fluorometilistidina, un inibitore dell'istidino decarbossi-

lasi e da un composto del p-difenilmetano, l'N,N,diethyl-2-[4-(fenilmetil)fenossiletanamina (DPPE), che, come il tamoxifene, blocca a livello microsomiale il sito recettoriale per gli estrogeni. Un recettore istaminergico H_4 è stato identificato nei progenitori delle cellule del sistema ematopoietico e dati recenti ottenuti in vitro indicano che l'attivazione di tale recettore controlla la crescita cellulare.

L'istamina stimola la secrezione gastrica acida dalla cellule parietali e aumenta la secrezione di pepsina e di fattore intrinseco

L'istamina secreta dalle cellule ECL diffonde a livello delle cellule parietali dove attiva il recettore istaminergico H_2 che essendo accoppiato alla adenilato ciclasi, stimola la formazione intracellulare di adenosin 3',5' monofosfato ciclico (cAMP) e il successivo trasferimento della pompa (H^+/K^+ ATPasi) da strutture tubulo-vescicolari intracellulari alla membrana plasmatica. In questo modo, non solo gli ioni H^+ vengono riversati nel lume gastrico, ma anche l'attività della pompa aumenta in quanto è in grado di scambiare ioni K^+ . L'attività della pompa è aumentata da una fosforilazione di una proteinchinasi A (PKA). Nelle cellule parietali sono stati messi in evidenza anche recettori specifici per la gastrina e gli analoghi colinergici. La gastrina secreta dalle cellule G-antrali stimola la secrezione gastrica e la proliferazione delle cellule mucose. La sua azione è mediata dalla stimolazione del recettore per la colecistochinina-B (CCKB o recettore per la gastrina), accoppiato a una proteina G e localizzato sulle cellule ECL, la cui stimolazione determina secrezione di istamina. L'acetilcolina secreta dai neuroni post-gangliari attiva direttamente le cellule parietali attraverso un recettore colinergico M_3 e indirettamente attivando i recettori colinergici M_2 ed M_4 che inibiscono la secrezione di somatostatina (Figura 36.4).

L'istamina non agisce soltanto come secretagogo, è an-

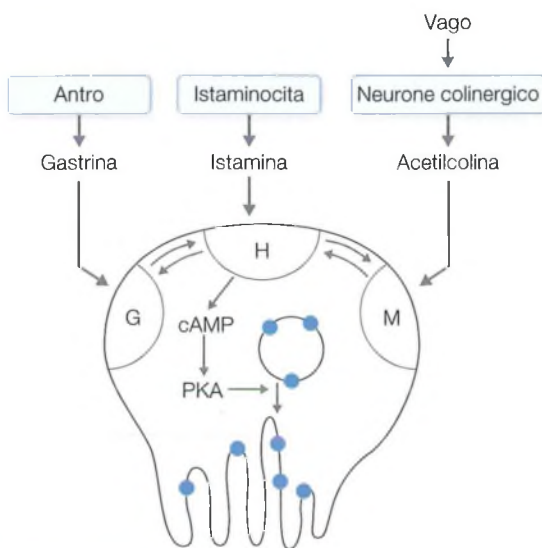


FIGURA 36.4 Rappresentazione schematica della secrezione gastrica. G: recettore gastrinico; H: recettore istaminergico H_2 ; M: recettore muscarinico. Per ulteriori dettagli sul ruolo della pompa protonica (pallini blu) nel rilascio dei ioni H^+ , vedi Capitolo 23.

che un fattore di crescita della mucosa. Topi *knockout* per l'istidino decarbossilasi, presentano alterazioni nel differenziamento cellulare, un effetto che in parte viene compensato da un aumentata sintesi di gastrina conseguente alla diminuita acidità gastrica; mentre topi *knockout* per il recettore istaminergico H_2 , sebbene sia presente ipergastrinemia, hanno un differente fenotipo senza alterazioni del differenziamento cellulare, suggerendo che l'istamina svolge la sua azione interagendo anche con il recettore istaminergico H_3 .

A livello della muscolatura liscia, gli effetti dell'istamina variano tra le diverse specie animali e tra tessuti diversi

L'istamina causa contrazione della muscolatura liscia intestinale, attraverso la stimolazione dei recettori istaminergici H_1 ; la contrazione dell'ileo di cavia è un classico test biologico per l'ammina; i recettori H_2 mediano il rilascio; i recettori H_3 hanno un ruolo inibitorio, modulando a livello presinaptico la neurotrasmissione. L'istamina causa broncocostrizione nella cavia e nell'uomo. Nella cavia la broncocostrizione è causa di morte da tossicità istaminica; nell'uomo, invece, in condizioni normali, la broncocostrizione evocata da normali concentrazioni di istamina non è marcata; tuttavia, i pazienti affetti da asma bronchiale sono estremamente sensibili all'istamina. L'azione spasmogena sulla muscolatura liscia bronchiale è mediata dai recettori H_1 ; è presente anche una contro-regolazione H_2 : gli antagonisti selettivi del recettore istaminergico H_2 non determinano broncocostrizione ma aumentano la risposta broncocostrittrice nel paziente asmatico. È presente anche una regolazione della broncocostrizione attraverso l'attivazione del recettore istaminergico H_3 presente a livello dei nervi colinergici e dei gangli parasimpatici, la cui attivazione inibirebbe la liberazione della sostanza P e l'infiammazione neurogenica.

L'istamina contribuisce al controllo della risposta immunitaria

La partecipazione dell'istamina al complesso *cross-talk* fra citochine e cellule implicate nella differenziazione dei linfociti Th1 e Th2 è stata recentemente sottolineata da diverse ricerche.

La recente scoperta del recettore istaminergico H_4 a livello dei mastociti e di altre cellule implicate nell'infiammazione ha focalizzato l'attenzione sull'utilizzo di antagonisti selettivi del recettore istaminergico H_4 nell'asma allergico e in patologie infiammatorie acute e croniche. Topi *knockout* per il recettore H_4 presentano minore infiammazione polmonare dopo stimolazione immunologica, con una riduzione della produzione di citochine Th2-dipendenti. Il recettore H_4 è stato evidenziato anche nel tessuto sinoviale di pazienti affetti da artrite reumatoide e osteoartrite; variazioni nell'espressione di questo recettore sono state correlate con la durata e la severità della malattia.

Sintesi e metabolismo dell'istamina

Sebbene l'istamina esogena possa essere captata dai diversi tessuti, è improbabile che l'istamina presente negli alimenti come tale o formatasi nel lume intestinale per decarbossilazione dell'istidina a opera della flora batterica contribuisca in maniera significativa al pool endogeno dell'ammina. L'istamina assunta con la dieta è infatti inattivata dai batteri intestinali a N-acetil-istamina e le piccole quantità dell'ammina che possono essere assorbite sono prontamente metabolizzate in sede epatica ed extraepatica.

L'istamina si forma per decarbossilazione dell'amminoacido L-istidina a opera dell'enzima L-istidino decarbossilasi

I tessuti di mammifero contengono due diversi enzimi capaci di decarbossilare l'istidina: una L-amminoacido decarbossilasi aromatica (AADC) che ha una bassa affinità per l'istidina e che può decarbossilare molti amminoacidi aromatici, e una istidino decarbossilasi specifica per il substrato L-istidina, la cui attività in molti tessuti è circa 100 volte inferiore alla AADC.

L'istidino decarbossilasi ha il piridossal fosfato (vitamina B6) come cofattore. L'enzima purificato consiste di due subunità di 55 kDa e nel ratto ha una sequenza amminoacidica in parte simile a quella della DOPA decarbossilasi. Studi biochimici, biofisici e immunologici hanno evidenziato l'esistenza di isoenzimi dell'IDC, conseguenti a modificazioni post-traslazionali o a varianti alleliche. L'istidino decarbossilasi specifica è particolarmente concentrata nello stomaco, nei mastociti e a livello dei neuroni istaminergici. A livello neuronale, l'istamina è trasportata nelle vescicole neuronali dal trasportatore vescicolare per le monoamine. L'attività dell'enzima può essere modulata attraverso la fosforilazione di una proteinchinasi cAMP-dipendente, e un suo aumento è conseguente alla sintesi ex-novo di enzima, in quanto è bloccata dagli inibitori della sintesi proteica. Alcuni composti (α -clorometilistidina, α -trifluorometilistamina) sono in grado di inibire l'enzima; tra questi, la α -fluorometilistidina (α -FMH) che si comporta come un substrato "suicida", attivando un inibitore irreversibile, potrebbe avere un potenziale ruolo terapeutico in alcune situazioni di patologia clinica come la mastocitosi.

L'istamina viene rapidamente metabolizzata in vivo

Nell'uomo il metabolismo dell'ammina avviene principalmente per N-demetilazione dell'anello aromatico a opera dell'enzima imidazolo-N-metiltransferasi che, trasferendo il gruppo metilico dell'S-adenosil-L-metionina, forma *tele*-metilistamina e S-adenosil-L-omocisteina, che è un inibitore della reazione.

Nel complesso, l'istamina viene eliminata per l'1-2% come ammina immodificata, per l'8% come *tele*-metilistamina, per il 60% come acido *tele*-metilimidazolacetico e per il 25% come acido imidazolacetico, coniugato in parte al ribosio (Figura 36.5).

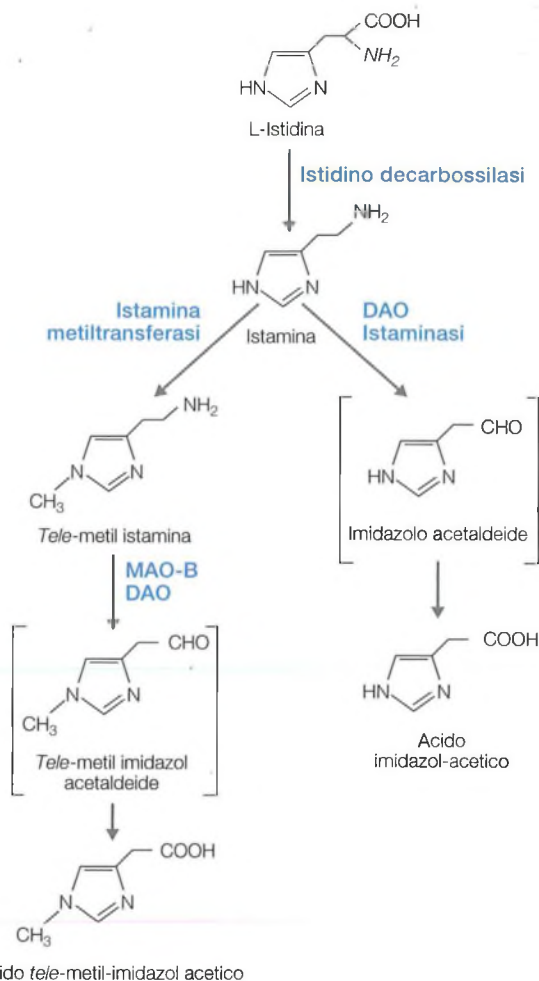


FIGURA 36.5 Struttura, sintesi e catabolismo dell'istamina.

Il metabolismo dell'istamina nel SNC è rapido e avviene soprattutto attraverso delle ossidasi

L'istamina neuronale è inattivata principalmente dalla istamina metiltransferasi, enzima selettivo per l'istamina e dalle monoamino ossidasi B (MAO B). Il turnover dell'istamina cerebrale, diverso da regione a regione, è rapido con la massima attività nell'ipotalamo (2-10 volte rispetto alle altre regioni cerebrali) e sembra diminuire nelle reazioni di stress; quello della frazione mastocitaria e vascolare è lento.

L'istamina metiltransferasi, localizzata con l'istamina nei neuroni tuberomammillari, è presente anche nella glia e nel liquido cerebrospinale. L'enzima è selettivo per l'istamina ed è inibito competitivamente da farmaci antimalarici come la quinacrina e l'amodiachina e da analoghi delle pirimidine, come la metoprina e la etoprina, che non hanno un uso clinico, ma sono stati utilizzati per studiare le funzioni dell'istamina cerebrale. La maggior parte della *tele*-metilistamina formatasi è deaminata da una MAO B ad acido *tele*-metil-imidazolacetico che è il principale metabolita urinario dell'istamina. La

tele-metilistamina è pertanto il principale metabolita dell'istamina nel cervello.

Una seconda via metabolica comprende la deaminazione ossidativa dell'ammina a opera di una diamino ossidasi (DAO, istaminasi) ad acido imidazolacetico, di cui una larga parte è eliminata con le urine come acido ribosil-imidazolacetico. L'acido imidazolacetico e il suo metabolita ribosilato sono stati identificati in alcune aree del cervello di ratto, l'acido imidazolacetico ha mostrato di possedere attività agonistica a livello del recettore GABAergico, mentre l'acido *tele*-metil-imidazolacetico agisce sul sito delle benzodiazepine, diminuendone l'attività. Substrato dell'istaminasi sono anche le poliamine, fra cui la putrescina. Nell'uomo alti livelli di istaminasi sono presenti nel tratto gastrointestinale, nel fegato, nel rene e nella placenta. Le MAO B sono inibite dal deprenil, un efficace antidepressivo; la aminoguanidina e la semicarbazide sono inibitori delle DAO, ma non hanno uso clinico.

Localizzazione intracellulare dell'istamina e modalità di secrezione

A livello del sistema nervoso centrale, sono presenti un *pool* neuronale e uno extraneuronale. A livello neuronale l'istamina è immagazzinata in vescicole sinaptiche e viene liberata da stimoli depolarizzanti; la liberazione è dipendente dalla presenza di calcio nel medium extracellulare, il quale entrerebbe all'interno della cellula attraverso l'apertura di un canale voltaggio-dipendente. La mancata dimostrazione, a livello del SNC, di un *uptake* ad alta affinità per l'ammina distingue l'istamina dalle altre ammine biogene (serotonina, noradrenalina, dopamina). Negli altri tessuti la maggior parte dell'istamina, sia di neosintesi che captata, è immagazzinata nei mastociti e nei basofili circolanti, dove è concentrata nei granuli metacromatici insieme ad altre sostanze farmacologicamente attive come l'eparina, peptidi, proteasi e proteoglicani. I grossi granuli elettrodensi in cui l'ammina è contenuta derivano dal raggrupparsi di "progranuli".

L'istamina può essere liberata dai granuli di deposito dei mastociti mediante due meccanismi. Composti endogeni ed esogeni come il composto 48/80, il destrano, la polimixina B, la d-curarina, ionofori come l'A23187 e l'X527A, lecitine come la concanavallina A, la neurotensina, la sostanza P, possono provocare la liberazione di istamina per esocitosi sequenziale, cioè attraverso un processo che implica la fusione delle membrane perigranulari con la membrana citoplasmatica e la successiva esposizione dei granuli all'ambiente extracellulare, dove l'istamina presente nel granulo in forma cationica viene liberata all'esterno della membrana cellulare. L'ammina può essere liberata anche attraverso un processo non esocitotico che prevede la lisi della membrana del mastocita.

Un importante meccanismo fisiopatologico per la liberazione di istamina è quello immunologico, conseguente all'interazione dell'antigene specifico con le IgE presenti sulla membrana citoplasmatica dei mastociti dei tessuti e dei basofili circolanti. La liberazione di istamina può avvenire anche nel corso di reazioni immunologiche IgG

o IgM-mediate, a seguito di attivazione del complemento (Figura 36.3).

La secrezione di istamina può essere inibita dagli agonisti β_2 -adrenergici, mentre un potenziamento della liberazione si osserva invece con gli agonisti muscarinici e α -adrenergici. Il processo secretorio è regolato in senso inibitorio anche da prostaglandine di tipo E che attivano l'adenilato ciclasi e dall'istamina stessa, attraverso l'attivazione del recettore H_2 . Alcuni composti, come il cromoglicato di sodio e il nedocromil possono prevenire la liberazione di istamina e pertanto sono usati nella profilassi dei disordini allergici come l'asma.

Recettori istaminergici e loro modulazione farmacologica

Si distinguono quattro tipi di recettori per l'istamina: H_1 , H_2 , H_3 e H_4

Sono tutti recettori metabotropici, accoppiati a proteine G, formati da sette domini trans-membrana. L'antagonista [3 H]-mepiramina è stato il primo legante selettivo per i recettori H_1 , e ancora presenta dei vantaggi rispetto agli altri radioligandi; l'antagonista [3 H]-tiodidina è usato come legante per i recettori H_2 . L'agonista [3 H]-R-(a)-metilistamina e l'antagonista [3 H]-tioperamide sono stati i primi legandi per il recettore H_3 , sebbene entrambi i composti abbiano affinità per il recettore H_4 . Successivamente sono stati descritti nuovi radioligandi per il recettore H_3 : [125 I]-iodofenpropit e [125 I]-iodoprossifan. La prima generazione di ligandi imidazolici per il recettore H_3 ha mostrato notevole affinità per il recettore H_4 . L'antagonista [3 H]-JNJ7777120 e la [3 H]-istamina sono usati come radioligandi per il recettore H_4 (Tabella 36.2) (vedi CD: Approfondimento 36.1. I recettori istaminergici e le loro vie di trasduzione del segnale).

Farmaci attivi sui recettori istaminergici

I farmaci attivi sui recettori istaminergici hanno un importante ruolo terapeutico. La ricerca di composti che antagonizzassero gli effetti fisiopatologici dell'istamina ha condotto nel 1937 alla scoperta del primo "anti-istaminico"; tale termine, nella pratica comune si riferisce agli antagonisti dei recettori H_1 . Successivamente, la scoperta dei recettori H_2 e lo sviluppo degli antagonisti hanno portato, a partire dal 1972, a un rinnovato interesse per i possibili ruoli fisiologici dell'istamina. Più recente è la farmacologia dei recettori istaminergici H_3 , e attualmente sono disponibili composti dotati di buona selettività verso tali recettori, alcuni dei quali sono in studio in trial clinici. Nonostante gli antagonisti dei recettori istaminergici H_4 siano promettenti candidati per il trattamento di situazioni infiammatorie, come la rinite allergica, l'asma, l'artrite reumatoide e, possibilmente, il prurito e il dolore neuropatico; un solo composto è in fase clinica per la rinite allergica.

TABELLA 36.2 Definizione farmacologica dei recettori istaminergici

Recettore	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄
Localizzazione (funzione)	<ul style="list-style-type: none"> Muscolatura liscia vie aeree, intestino, vasi (contrazione) SNC (sonno-veglia; assunzione cibo; termoregolazione) Cuore (effetto inotropo e cronotropo positivo) 	<ul style="list-style-type: none"> Cuore (effetto inotropo e cronotropo positivo) Stomaco (secrezione acida) Utero (contrazione) SNC (processi neuroendocrini) 	<ul style="list-style-type: none"> SNC (inibizione sintesi e liberazione istamina; inibizione liberazione neurotrasmettitori) Polmone (inibizione sintesi istamina; inibizione contrazione neurogena) Intestino (inibizione liberazione neurotrasmettitori) Stomaco (inibizione secrezione acida) 	<ul style="list-style-type: none"> Midollo osseo Milza Eosinofili, neutrofilii, monociti Mast cells Cellule CD4+
Effettore	<ul style="list-style-type: none"> IP₃/DAG 	<ul style="list-style-type: none"> cAMP (aumento) 	<ul style="list-style-type: none"> cAMP (diminuzione) Influsso di Ca²⁺ (riduzione) 	<ul style="list-style-type: none"> cAMP (diminuzione) Influsso di Ca²⁺ (riduzione)
Agonisti	<ul style="list-style-type: none"> 2-tiazoletilamina 2-fenilistamina 	<ul style="list-style-type: none"> Dimaprit Impromidina 	<ul style="list-style-type: none"> R-(α)-metilistamina Imetit 	<ul style="list-style-type: none"> Imetit Immepip
Antagonisti	<ul style="list-style-type: none"> Mepiramina Tripolidina 	<ul style="list-style-type: none"> Cimetidina Ranitidina Tiotidina 	<ul style="list-style-type: none"> Tioperamide Clobenpropit 	<ul style="list-style-type: none"> JNJ 7777120 JNJ 10191584
Radioligandi	<ul style="list-style-type: none"> [³H]-mepiramina 	<ul style="list-style-type: none"> [³H]-tiotidina 	<ul style="list-style-type: none"> [¹²⁵I]-iodofenpropit 	<ul style="list-style-type: none"> [³H]-istamina JNJ 7777120

Principali interventi farmacologici sul sistema istaminergico

Numerosi farmaci attualmente usati o che potranno avere un futuro uso terapeutico interferiscono con la trasmissione istaminergica (Figura 36.6).

Sintesi L'amminoacido L-istidina può aumentare sperimentalmente la sintesi di istamina cerebrale, ma ciò non è utile terapeuticamente. L' α -fluoro-metilistidina è un inibitore irreversibile dell'istidino-decarbossilasi; tale composto non ha usi clinici.

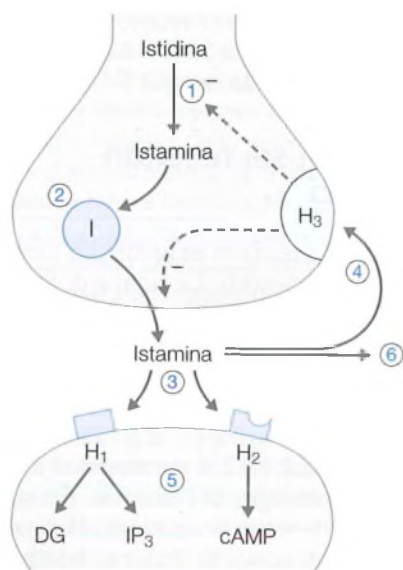


FIGURA 36.6 Neurone istaminergico e suoi bersagli farmacologici. Decarbossilazione dell'istidina a istamina (inibita dall' α -fluoro-metilistidina) (1); immagazzinamento dell'istamina in granuli (2); interazione con i recettori postsinaptici H₁ e H₂ (3); interazione con i recettori presinaptici H₃ (inibizione della sintesi e della liberazione di istamina) (4); sistemi di trasduzione (5); allontanamento dalla fessura sinaptica e inattivazione metabolica (6).

Liberazione La liberazione di istamina neuronale è facilitata dalla reserpina; molti altri farmaci (specialmente composti basici, come la d-tubocurarina, la morfina, la codeina, il destrano) liberano l'istamina mastocitaria, che può essere inibita dal cromoglicato di sodio e dal nedocromil, farmaci usati come antiallergici.

Ricaptazione Non si conoscono molecole che interferiscono con la ricaptazione dell'istamina.

Catabolismo Farmaci antimalarici (quinacrina, amodia-china) e analoghi della pirimidina (metoprina e etoprina) e un inibitore della acetilcolinesterasi (tacrine) sono inibitori dell'istamina-N-metiltransferasi. Il deprenil, un inibitore delle MAO-B, è un efficace antidepressivo; la aminoguanidina e la semicarbazide sono inibitori delle DAO, ma non hanno usi clinici.

Recettori H₁ Esistono molti antagonisti H₁ usati terapeuticamente, tra questi: difenidramina, mepiramina, antazolina, terfenadina e loratadina sono usati come antiallergici. Ciclizina e meciclizina per il trattamento della chinetosi e della sindrome di Ménière. Prometazina come antiemetico e per il controllo della rigidità nelle sindromi parkinsoniane, per le sue proprietà anticolinergiche. Ciproepadina come stimolante l'appetito.

Recettori H₂ Betazolo e dimaprit agonisti dei recettori H₂, sono stati usati per valutare le capacità secretive acide dello stomaco. Cimetidina, ranitidina, tiotidina, nizatidina e famotidina sono antagonisti selettivi del recettore H₂, usati per la terapia dell'ulcera peptica e della sindrome di Zollinger-Ellison. L'antidepressivo mianserina ha azione antagonista sui recettori H₂.

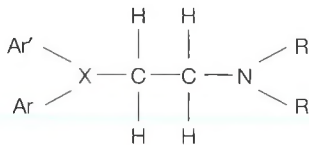
Recettori H₃ L'R(α)-metilistamina, l'imetit e l'imepip sono agonisti H₃, e la tioperamide e il clobenpropit sono antagonisti H₃; non hanno al momento usi clinici. Il pitolisant, un agonista inverso, è in fase clinica per i disturbi cognitivi.

Recettori H_1 l'imetit e l'immepip sono agonisti H_1 . JNJ 777120 e UR 65318 sono antagonisti H_1 . Il composto UR 65318 (Palau Pharma) è in studio clinico per il prurito.

Nella tabella 36.3 sono riportate le principali sostanze farmaceutiche presenti nel Repertorio Farmaceutico Italiano. Nel consultare questa tabella riassuntiva, vedi anche figura 36.6.

Gli antagonisti dei recettori H_1 sono usati nelle reazioni allergiche

La 2-metilistamina e particolarmente la 2-tiazoliletilamina (2-TEA) sono agonisti recettoriali H_1 , tuttavia non specifici. Più abbondanti sono i farmaci antagonisti. La maggior parte degli antagonisti dei recettori H_1 sono delle etilamine sostituite, la cui formula di struttura può essere così schematizzata:



I gruppi R, in genere rappresentati da metili, Ar e Ar' indicano anelli arilici o eteroarilici che conferiscono a queste molecole un'elevata liposolubilità. A seconda di quale atomo sia rappresentato da X, si distinguono: etanolamine (X = O: difenilidramina); etilendiamine (X = N, mepiramina; antazolina; tripeleminina); alchilamine (X = C: clorfeniramina, triprolidina). Esistono antiistaminici piperazinicici (ciclizina e meclizina), piperidinici (terfenadina) e fenotiazinici (ad esempio, prometazina). Gli antistaminici anti- H_1 trovano il loro maggiore impiego per la prevenzione e la terapia delle reazioni allergiche. Sono da tempo usati e prescritti per tale scopo la clorfeniramina, la mepiramina e la prometazina.

I più recenti antagonisti dei recettori H_1 dotati di scarso effetto sedativo (fexofenadina, loratadina), sono ampiamente usati per il trattamento della rinite allergica e della orticaria cronica. La ciclizina e la meclizina sono utilizzate per le chinetosi e la sindrome di Ménière.

Gli effetti sedativi sono legati al blocco dei recettori H_1 centrali. Antagonisti H_1 meno lipofili e quindi con minore capacità di penetrazione della barriera ematoencefalica e forse dotati di una maggiore affinità per i recettori H_1 periferici sono stati recentemente messi in commercio (terfenadina, loratadina). Molti composti possiedono azioni farmacologiche diverse da quelle anti-istaminiche. Sono anticolinergici, con attività atropino-simile, specialmente i derivati etanolaminici ed etilendiaminici. Questa azione può essere la causa di ritenzione urinaria e offuscamento della visione; inoltre possiedono significativi effetti sulle sindromi parkinson-simili che accompagnano l'uso di certi farmaci antipsicotici. Deboli azioni α -bloccanti sono state dimostrate per alcuni antiistaminici del sottogruppo delle fenotiazine, responsabili di episodi di ipotensione ortostatica. Alcuni antagonisti H_1 hanno anche proprietà anestetico-locali (dimetindene, mepiramina) e chinidino-simili. Gli antidepressivi trici-

TABELLA 36.3 Principali sostanze farmaceutiche attive sul sistema istaminergico presenti nel Repertorio Farmaceutico Italiano (2010)

Sostanza farmaceutica	Meccanismo d'azione	Principali indicazioni cliniche
Cromoglicato di sodio	Inibitore del rilascio di istamina	Asma allergico, allergie alimentari
Nedocromil	Inibitore del rilascio di istamina	Asma allergico
Antazolina	Antagonista H_1	Congiuntivite allergica
Cetirizina	Antagonista H_1	Rinite allergica, orticaria
Chetotifene	Antagonista H_1	Asma allergico
Ciclizina	Antagonista H_1	Cinetosi, sindrome di Ménière
Ciproptadina	Antagonista H_1	Stimolante l'appetito
Clorfeniramina	Antagonista H_1	Rinite e congiuntivite allergica
Dimetindene	Antagonista H_1	Asma allergico, shock anafilattico
Ebastina	Antagonista H_1	Rinite allergica
Fexofenadina	Antagonista H_1	Rinite allergica, orticaria
Mepiramina	Antagonista H_1	Rinite allergica
Mizolastina	Antagonista H_1	Rinite allergica, orticaria
Oxatomide	Antagonista H_1	Dermatite pruriginosa, eritema solare
Prometazina	Antagonista H_1	Antiemetico, induzione del sonno
Cimetidina	Antagonista H_2	Ulcera peptica, sindrome di Zollinger-Ellison
Ranitidina	Antagonista H_2	
Famotidina	Antagonista H_2	
Nizatidina	Antagonista H_2	
Roxatidina	Antagonista H_2	
Deprenil	Inibitore MAO-B	Antidepressivo
Reserpina	Aumento liberazione istamina	Antipertensivo
Tacrine	Inibitore IMT	Morbo di Alzheimer

IMT: istamina metiltransferasi

clici (particolarmente la doxepina) e non (mianserina) e alcuni neurolettici anti-dopaminergici hanno anche azioni antistaminiche anti- H_1 e questo può avere riferimento con gli effetti sedativi e contribuire agli effetti terapeutici specifici.

Gli antistaminici anti- H_1 sono ben assorbiti dopo somministrazione orale, il loro effetto si manifesta entro 15-30 minuti, è massimo dopo un'ora e persiste per 3-6 ore. Provocano alle dosi terapeutiche una serie di effetti collaterali; la sedazione è l'effetto più comune provocato da tutti gli anti- H_1 sebbene in maniera quantitativamente differente. L'incidenza dei disturbi gastrointestinali è elevata. Manifestazioni allergiche anche di tipo anafilattico possono verificarsi dopo la loro somministrazione; la capacità istamino-liberatrice di alcuni farmaci può spiegare l'insorgenza di questi fenomeni.

Gli antagonisti dei recettori H_2 sono tra i farmaci più utilizzati per la terapia dell'ulcera peptica

La disponibilità di agonisti (dimaprit, impromidina) e di antagonisti (cimetidina, ranitidina, famotidina, nizatidina) ha portato alla caratterizzazione del recettore istaminergico H_2 , il quale ha un ruolo di primaria importanza a livello gastrico, per il controllo della secrezione cloro-peptica. La più importante azione degli antagonisti H_2 consiste nel bloccare la secrezione acida stimolata da istamina, gastrina, farmaci colinergici e dalla stimolazione vagale, diminuendo sia la concentrazione idrogenionica che la quantità della secrezione. Tali molecole trovano ampio uso nell'ulcera peptica, nel reflusso gastroesofageo e nella sindrome di Zollinger-Ellison. Nell'ulcera peptica, gli antagonisti recettoriali H_2 alleviano i sintomi e promuovono la guarigione della lesione. Nella sindrome di Zollinger-Ellison, in cui l'ipersecrezione acida è dovuta a un tumore che secreta gastrina, gli H_2 -bloccanti sono efficaci nel controllare la sintomatologia legata all'eccessiva ipersecrezione acida e sono usati sia come trattamento primario che come terapia preparatoria per l'intervento chirurgico.

Un antagonismo farmacologico dei recettori H_2 centrali può verificarsi in particolari situazioni e si esplica con irrequietezza, disorientamento, talvolta allucinazioni; si è osservato anche iperprolattinemia.

Questi farmaci sono ben tollerati e solo nell'1-2% dei pazienti si verificano effetti indesiderati. La cimetidina può indurre ginecomastia nell'uomo, galattorrea nella donna

e granulocitopenia. La cimetidina inibisce le reazioni del metabolismo ossidativo catalizzate dal citocromo CYP 3A4 e dà luogo, quindi, a numerose interazioni farmacologiche.

Nuove prospettive di utilizzo di farmaci attivi sui recettori H_3 e H_4 .

La scoperta di questi recettori istaminergici è abbastanza recente e al momento si possono avere solo delle indicazioni preliminari su quali vie possano essere seguite per un intervento terapeutico. Il recettore H_3 è presente nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo, nell'amigdala, nello striato, nei gangli della base e nell'ipotalamo. La sua localizzazione è prevalentemente presinaptica e come autorecettore modula la secrezione di istamina, mentre come eterorecettore regola principalmente la liberazione di glutammato, acetilcolina, noradrenalina, dopamina, GABA e serotonina. A livello del SNC i recettori H_3 sono implicati nel meccanismo sonno-veglia, nei processi cognitivi e nella memoria. Agonisti inversi H_3 sono stati proposti nel deficit dell'attenzione associato a iperattività motoria e nei disturbi della memoria, nella narcolessia, e nel dolore neuropatico. Farmaci attivi sui recettori H_4 sono in uno stadio ancora sperimentale e vengono studiati nella prospettiva di diminuire il prurito e nel dolore neuropatico.

TAKE HOME MESSAGE

- ▀ Il sistema istaminergico è stato uno dei primi a essere scoperto e studiato.
- ▀ Esso ha una grande varietà di effetti sul sistema nervoso centrale, sul microcircolo, sulla funzionalità cardiaca, sulla regolazione della composizione dei succhi gastrici, sulla risposta immune.
- ▀ I farmaci attivi sul sistema istaminergico sono impiegati soprattutto nel controllo delle riniti allergiche e nella regolazione dell'acidità gastrica.
- ▀ La scoperta di nuovi recettori e di nuovi farmaci attivi su di essi fa intravedere che sarà possibile un uso ulteriore di farmaci in questo settore per il controllo di funzioni del SNC e dell'immunità.

Bibliografia essenziale

- ▀ Berlin M, Boyce CW, de Lera Ruis M. Histamine H_3 Receptor as a Drug Discovery target. *J Med Chem* 2011;54:26-53.
- ▀ Leurs R, Chazot P, Shenton F et al. Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H_4 receptor. *Br J Pharm* 2009;157:14-23.
- ▀ Thurmond R, Gelfand E, Dunford P. The role of histamine H_1 and H_4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:41-53.
- ▀ Tiligada E, Kyriakidis K, Chazot P, Passani MB. Histamine Pharmacology and New CNS Drugs Targets. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 2010;1:9. Article first published online: 22 nov 2010.
- ▀ Tiligada E, Zampeli E, Sander K, Stark H. Histamine H_3 and H_4 receptors as novel drug targets. *Expert Opin Investig Drugs*, 2009;18:1519-31.

La trasmissione GABAergica

Mariangela Serra, Enrico Sanna, Giovanni Biggio

Obiettivi formativi

- Descrivere la sintesi e il catabolismo del GABA
- Comprendere la distinzione fra trasmissione "rapida", mediata dai recettori GABA_A, e "lenta", mediata dai recettori GABA_B
- Descrivere la struttura molecolare dei recettori GABA_A e GABA_B e saper definire il concetto di eterogeneità di questi recettori
- Comprendere il concetto di inibizione "fasica" e inibizione "tonica"
- Descrivere le principali classi di farmaci e sostanze che agiscono sui differenti recettori del GABA in relazione al loro meccanismo d'azione
- Definire il significato neurofisiologico di inibizione sinaptica e il ruolo del GABA

Questo capitolo è dedicato alla trattazione della trasmissione sinaptica mediata dall'acido γ -aminobutirrico (GABA), il principale neurotrasmettitore con funzione inibitoria presente nel sistema nervoso centrale (SNC) dei mammiferi. I diversi tipi di recettori del GABA non solo svolgono un ruolo fisiologico cruciale nella regolazione dell'eccitabilità neuronale in tutte le aree del SNC, ma rappresentano anche il bersaglio molecolare di numerose classi di farmaci di rilevanza clinica, quali benzodiazepine e anestetici generali, di ormoni endogeni come i neurosteroidi, nonché di sostanze d'abuso quali l'etanolo.

Il GABA fu identificato per la prima volta nel 1950 da E. Roberts e S. Frankel, in estratti cerebrali di differenti specie animali. Solo alcuni anni dopo fu suggerito che il GABA avesse un'azione inibitoria a livello di differenti strutture nervose. Ulteriori studi permisero di classificare il GABA come un amminoacido che nel SNC dei mammiferi ha funzione di neurotrasmettitore inibitore, cioè una sostanza prodotta dalle cellule nervose e da queste liberata nello spazio sinaptico per trasmettere un messaggio inibitorio ad altre cellule nervose. Il GABA è il neurotrasmettitore inibitore più abbondante presente nel cervello dei mammiferi (circa il 35-40% delle sinapsi sono GABAergiche) e ha un ruolo rilevante nel controllo di varie funzioni cerebrali e quindi nella fisiopatologia di numerose malattie mentali e neurologiche. La compren-

sione degli eventi molecolari che partecipano all'azione del GABA a livello sinaptico ha permesso di identificare alcuni meccanismi biologici coinvolti nel controllo delle emozioni e dell'eccitabilità neuronale e di scoprire nuovi agenti terapeutici utili nella terapia dei disturbi d'ansia e della patologia epilettica.

Distribuzione, sintesi e metabolismo del GABA

■ Il GABA è il neurotrasmettitore inibitore più diffuso

La distribuzione del GABA e della glutammato decarbossilasi (GAD), enzima deputato alla sua sintesi, nel SNC non è uniforme. Le massime concentrazioni si trovano nella substantia nigra, nel globo pallido, nell'ipotalamo, nei corpi quadrigemini, nella corteccia cerebrale, nel cervelletto e nell'ippocampo. Concentrazioni minori sono presenti nel ponte, nel bulbo e nella sostanza bianca. Neuroni GABAergici presenti nello striato formano la via GABAergica striato-nigrale, che ha la sua origine nel nucleo caudato e nel globo pallido e proietta nella pars reticulata della substantia nigra. Dalla substantia nigra originano le vie nigro-collicolare e nigro-talamica che dalla pars reticulata proiettano negli strati profondi del collicolo superiore e nei nuclei del talamo (ventromediale, medio-dorsale e intralaminare), e la via nigro-

tegmentale che proietta al tegmento ponto-mesencefalico. Neuroni positivi per la GAD si trovano anche nel nucleo arcuato e nei nuclei periventricolari dell'ipotalamo medio-basale. Nell'ippocampo sono presenti specifici interneuroni GABAergici che formano sinapsi con le cellule piramidali ippocampali.

Nel cervelletto il GABA ha la massima concentrazione nello strato delle cellule di Purkinje e a livello dei nuclei profondi, dove proiettano gli assoni GABAergici delle cellule del Purkinje, le quali rappresentano la sola via efferente dal cervelletto. Elevate concentrazioni di GABA sono inoltre presenti nelle cellule a canestro e nelle cellule stellate con cui le cellule del Purkinje contraggono collegamenti sinaptici e nelle cellule del Golgi II che sono in contatto sinaptico con i dendriti delle cellule granulari. Il GABA è presente anche nelle cellule gliali che, tramite uno specifico sistema di uptake e di catabolismo, contribuiscono all'allontanamento di questo aminoacido dallo spazio sinaptico (Figura 37.1).

Il GABA si forma dalla decarbossilazione dell'acido glutammico

Questa reazione è catalizzata dalla GAD, enzima altamente specifico che ha come cofattore il piridossal-fosfato ed è inibito da diversi antagonisti del piridossal-fosfato, come i composti idrazinici (isoniazide, tiosemicarbazide). La distribuzione della GAD nel SNC riflette quella del GABA; l'enzima si trova quasi esclusivamente nel citoplasma delle terminazioni nervose in forma solubile. Il GABA, sintetizzato nel citoplasma, è immagazzinato

nelle vescicole sinaptiche presenti nella porzione terminale degli assoni (Figura 37.1). L'accumulo vescicolare di GABA è effettuato da un trasportatore specifico che utilizza, come fonte di energia, sia il gradiente elettrico che di pH presente tra il lume vescicolare e il citoplasma e generato dalla H-ATPasi (pompa protonica) vescicolare. Il GABA viene degradato dall'enzima GABA- α -chetoglutaricotransaminasi (GABA-T) che lo deamina a semialdeide succinica; questa viene ossidata ad acido succinico, a opera di una semialdeide-succinico-deidrogenasi NAD-dipendente, il quale entra nel ciclo di Krebs. Il gruppo amminico viene trasferito dalla GABA-T a una molecola di α -chetoglutarato per formare l'acido glutammico il quale viene riutilizzato per la sintesi di nuovo GABA. GABA-T e semialdeide succinica si trovano sempre legati ai mitocondri non solo nel terminale assonale ma anche nelle strutture postsinaptiche e nelle cellule gliali; in queste ultime, l'acido glutammico viene trasformato in glutamina mediante la glutammina sintetasi. La glutammina viene rilasciata e poi ricatturata dalla terminazione GABAergica dove, a opera di una glutamminali, viene riconvertita in acido glutammico e quindi in GABA. L'inibizione farmacologica della GABA-T (indotta da farmaci come l'etanolamina-O-solfato, il γ -vinil-GABA e l'acido valproico) si traduce in un aumento della concentrazione di neurotrasmettitore e in potenziamento della sinapsi GABAergica. Alcuni dei farmaci capaci di inibire la GABA-T trovano un importante uso nella terapia di alcune forme di epilessia (vedi CD: Approfondimento 37.1. *Farmaci antiepilettici con meccanismo d'azione GABAergico*).

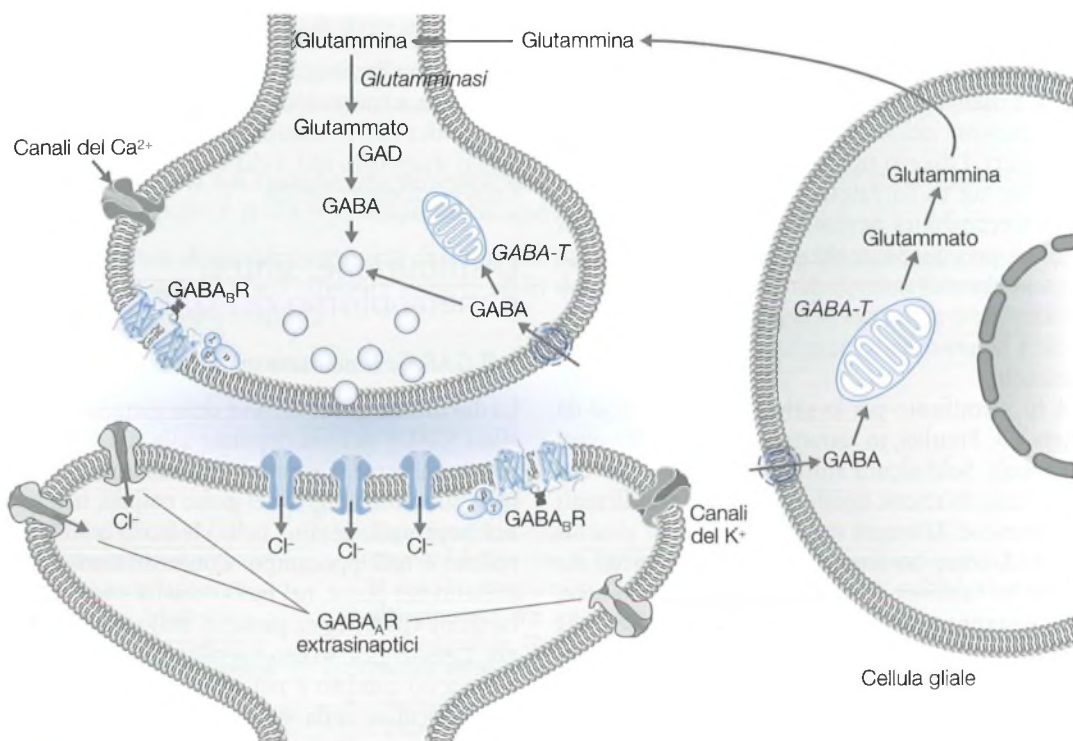


FIGURA 37.1 Rappresentazione schematica di una sinapsi GABAergica dove sono illustrati il terminale presinaptico che libera GABA su recettori postsinaptici ($GABA_A$ e $GABA_B$) e una cellula gliale. Il processo di sintesi e di catabolismo del GABA è riportato sia a livello neuronale che nella cellula gliale. Sulla membrana postsinaptica sono indicati inoltre recettori $GABA_A$ extrasinaptici.

Liberazione e ricaptazione del GABA

■ Il GABA viene liberato da vescicole sinaptiche

Studi in vitro hanno dimostrato che il GABA viene liberato sia spontaneamente sia in seguito a stimolazione nervosa. La liberazione di GABA indotta dalla depolarizzazione, a differenza di quella spontanea, è un fenomeno Ca^{2+} -dipendente.

A livello delle terminazioni GABAergiche esistono molteplici proteine trasportatrici (GAT-1, GAT-2, GAT-3 e BGT-1; vedi Capitolo 24) che rimuovono rapidamente il GABA dallo spazio sinaptico, ponendo così fine alla sua azione. Esse cotrasportano GABA, Cl^- e Na^+ , sono presenti sia a livello della terminazione nervosa sia sulle cellule gliali e sono differenziabili farmacologicamente sulla base della loro diversa sensibilità all'acido carbossilico cis-1,3-aminocicloesano (ACHC) (maggiore affinità per il trasportatore neuronale) e alla β -alanina (maggiore affinità per il trasportatore gliale). Si ritiene che il mantenimento delle basse concentrazioni di GABA negli spazi extracellulari sia dovuto soprattutto all'attività del trasportatore gliale. Farmaci inibitori dei sistemi di ricaptazione, come l'acido 2,4-diaminobutirrico (DABA), l'acido nipecotico e la β -alanina possiedono attività anti-epilettica. Un analogo dell'acido nipecotico, la tiagabina, è attualmente in fase di avanzata sperimentazione clinica per la terapia dell'epilessia parziale refrattaria ad altri trattamenti (vedi CD: Approfondimento 37.1).

Recettori per il GABA

■ Recettori $GABA_A$ e recettori $GABA_B$

Studi elettrofisiologici e biochimici hanno dimostrato l'esistenza di due differenti siti di legame per il GABA convenzionalmente denominati $GABA_A$ e $GABA_B$; questi differiscono fra loro per struttura molecolare, meccanismo di trasduzione del segnale, distribuzione, funzione e profilo farmacologico.

I recettori $GABA_A$ sono recettori-canale permeabili allo ione Cl^- caratterizzati da una elevata sensibilità alla bicucullina e al muscimolo (rispettivamente antagonista e agonista selettivi del GABA ad alta affinità) che contengono siti specifici di legame per le benzodiazepine e per i barbiturici che ne modulano la funzione. Una sottopopolazione di recettori $GABA_A$, accoppiati a un canale al Cl^- ma insensibili alla bicucullina, sono localizzati nella retina.

I recettori $GABA_B$, accoppiati a proteine G inibitorie, sono attivati selettivamente dal derivato del GABA, β -p-clorofenil GABA (baclofen) e, al contrario dei recettori $GABA_A$, sono insensibili alla bicucullina e al muscimolo.

Recettori $GABA_A$

■ I recettori $GABA_A$ sono recettori-canale permeabili agli ioni Cl^-

I recettori $GABA_A$ sono canali al Cl^- ligando-dipendenti e rappresentano il principale meccanismo attraverso il quale

il GABA può trasmettere un segnale inibitorio "rapido", nell'ordine di pochi millisecondi, al neurone postsinaptico. Caratterizzato inizialmente per la sua sensibilità all'agonista selettivo muscimolo, così come alla bicucullina (antagonista competitivo) e alla picrotossina (bloccante del canale al Cl^-), il recettore $GABA_A$ gioca, in virtù della sua ampia diffusione in tutto il SNC dei mammiferi, un ruolo importante virtualmente in tutte le funzioni neuronali e rappresenta anche il bersaglio molecolare dell'azione di molteplici classi di farmaci di rilevanza clinica.

Poiché il Cl^- è il principale ione permeante attraverso il canale associato recettore $GABA_A$, l'attivazione di quest'ultimo "fissa" il potenziale di membrana a un valore prossimo a quello d'equilibrio del Cl^- , che normalmente è di circa -70 mV. L'attivazione di questo recettore riduce quindi, mediante iperpolarizzazione, la probabilità che i potenziali postsinaptici eccitatori possano raggiungere il valore soglia per la generazione del potenziale d'azione. Tuttavia, in alcuni distretti, come ad esempio alcune terminazioni a livello del midollo spinale e nei dendriti di specifici neuroni ippocampali e corticali, il potenziale d'equilibrio del Cl^- sembra essere spostato verso livelli meno elettronegativi (probabilmente per carenza di sistemi di estrusione dello ione) e l'attivazione del recettore causa una perdita di cariche negative (il Cl^- esce dalla cellula); la conseguente depolarizzazione può generare un potenziale d'azione per attivazione dei canali del Na^+ voltaggio-dipendenti. Un simile meccanismo sembra aver luogo in molti tipi di neuroni durante la fase di sviluppo.

La risposta inibitoria indotta dall'attivazione del recettore $GABA_A$ si attua attraverso meccanismi pre- e postsinaptici. L'iperpolarizzazione postsinaptica è tipica dei neuroni encefalici (cellule corticali, cerebellari, ippocampali ecc.). La risposta eccitatoria (depolarizzazione) a livello presinaptico si attua nel midollo spinale attraverso sinapsi asso-asoniche tra interneuroni GABAergici e le afferenze primarie eccitatorie che modulano l'attività dei motoneuroni.

Siti di legame per GABA, benzodiazepine e barbiturici

A livello del complesso recettoriale macromolecolare $GABA_A$ sono presenti i seguenti siti di legame per specifiche molecole (Figura 37.2).

Sito di legame per il GABA, per i farmaci GABA-mimetici (muscimolo) e GABA-antagonisti (bicucullina)

Questo sito di legame è localizzato in corrispondenza delle regioni di interfaccia tra la subunità α e quella β , ed è ben conservato tra le diverse isoforme delle due subunità. L'interazione con due molecole di GABA o di un GABA-mimetico si traduce in una modificazione conformazionale del complesso proteico che determina l'apertura del canale al Cl^- con conseguente iperpolarizzazione della membrana. La bicucullina e il composto SR95331 (gabazina) bloccano con meccanismo competitivo l'interazione GABA-recettore.

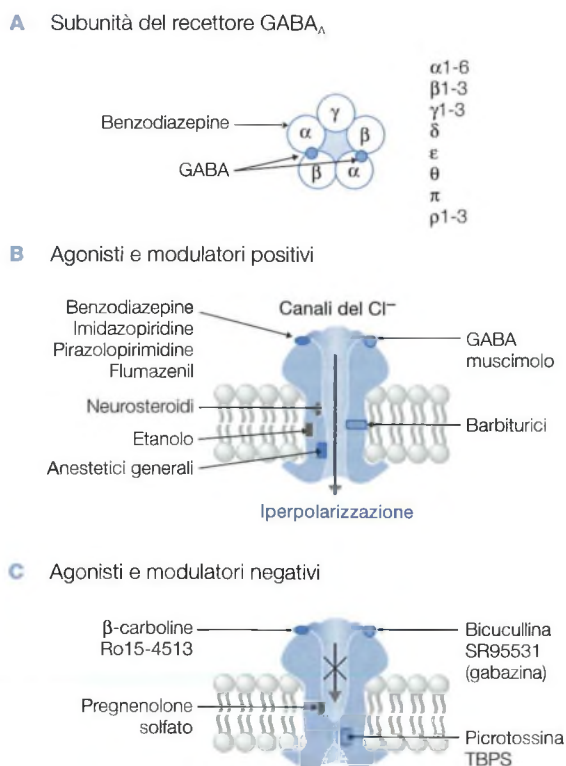


FIGURA 37.2 Rappresentazione schematica ipotetica della struttura molecolare del recettore GABA_A. In **A** sono indicate le tre differenti subunità α , β , γ necessarie per costituire un recettore funzionalmente sensibile sia all'azione dei barbiturici (α - β) che delle benzodiazepine (α - γ). Il rapporto tra subunità (nella figura 2 α , 2 β , 1 γ) può variare nelle diverse aree del SNC. In **B** e **C** sono ipotizzati due differenti momenti funzionali del canale allo ione Cl^- : attivato (**B**), inibito (**C**). Sono riportati i siti di legame di differenti modulatori positivi (**B**) e negativi (**C**).

Sito di legame per le benzodiazepine e altre molecole benzodiazepino-mimetiche

Questo sito si trova sui recettori formati dalle subunità α , β , e γ , ed è localizzato, in particolare, nell'interfaccia fra la subunità α e quella γ . Non sorprende quindi che la sensibilità dei diversi sottotipi di recettori GABA_A nei confronti di questa classe di molecole sia principalmente determinata dalle specifiche isoforme delle subunità α e γ coinvolte nella formazione del recettore GABA_A. L'interazione su questo sito di benzodiazepine o di ligandi benzodiazepino-mimetici (agonisti) determina un aumento della capacità del GABA di attivare il canale al Cl^- , un effetto che si traduce, in vivo, in riduzione dell'ansia, sedazione, ipnosi e miorelaxamento. Lo stesso sito è riconosciuto anche da ligandi ad azione di agonista inverso (β -carbolina), molecole capaci di ridurre l'interazione del GABA con il proprio sito di riconoscimento e indurre effetti (ansia-convulsioni) opposti a quelli delle benzodiazepine. Il sito di legame delle benzodiazepine è riconosciuto anche da farmaci privi di attività intrinseca (antagonisti competitivi come il flumazenil), ma capaci di antagonizzare sia l'azione degli agonisti che quella degli agonisti inversi. Questo sito, oggi denominato "recettore

centrale per le benzodiazepine", è uno dei pochi esempi di recettore dotato della capacità di mediare effetti opposti (ansiolitico-ansioigenico; anticonvulsivante-convulsivante; ipnotico-sonnolitivo) quando viene attivato rispettivamente dagli agonisti o dagli agonisti inversi. Questi opposti effetti sono dovuti alla modulazione allosterica dell'interazione del GABA con il proprio sito di riconoscimento (facilitazione per gli agonisti, inibizione per gli agonisti inversi) e la conseguente attivazione o riduzione di attività del canale ionico.

Sito di legame per i barbiturici e per il loro antagonista, la picrotossina, e siti di legame per alcuni derivati organofosforici come il t-butilbiciclofosforotionato (TBPS)

I siti allosterici di legame per i barbiturici e per il TBPS si trovano all'interno o in prossimità del canale al Cl^- . Tale localizzazione risulta essere di fondamentale importanza funzionale: infatti i barbiturici, al contrario delle benzodiazepine sono capaci di potenziare il flusso di Cl^- anche in assenza di GABA. La picrotossina e il TBPS (farmaci ad azione antagonista rispettivamente diretta e allosterica sui barbiturici) bloccano la funzione del canale ionico e inducono effetti farmacologici opposti (ansia, convulsioni).

Sito di legame per gli steroidi neuroattivi come allopregnanolone e THDOC

Studi recenti hanno identificato due siti differenti di interazione con gli steroidi neuroattivi a livello del recettore GABA_A. In particolare, uno di questi siti è localizzato sulla subunità α a livello del primo dominio transmembrana (M1) e media l'effetto di modulazione positiva dell'azione del GABA. Il secondo sito, che invece media l'azione diretta GABA-mimetica di questi ormoni, è localizzato all'interfaccia fra la subunità α e quella β . La subunità δ , importante per aumentare l'azione degli steroidi neuroattivi sul recettore GABA_A, non partecipa direttamente alla formazione di questi siti di legame.

I siti di legame per il GABA, le benzodiazepine, i barbiturici e gli steroidi pur essendo entità distinte sono legati tra loro in modo funzionale: l'attivazione e l'inibizione di uno di questi siti da parte di uno specifico ligando agonista o antagonista determina una variazione nella capacità degli altri siti di interagire con i propri ligandi specifici. Questo può tradursi in una modulazione positiva (facilitazione) o negativa (inibizione) della funzione dell'attività del recettore-canale (Figura 37.2).

Ad esempio, l'interazione di una benzodiazepina con il proprio sito di legame determina una modificazione allosterica nella conformazione delle subunità che partecipano alla formazione del sito di legame per il GABA tale da favorirne l'interazione con il neurotrasmettitore e la conseguente apertura del canale agli ioni Cl^- . L'influsso di cariche negative (Cl^-) che ne consegue determina iperpolarizzazione. Al contrario, se un agonista inverso interagisce con il sito di legame per le benzodiazepine, si ha il fenomeno opposto, cioè la subunità che contiene il sito di riconoscimento per il GABA assume una confor-

mazione "negativa" tale da sfavorire l'interazione con il GABA e quindi ridurre la capacità di apertura del canale. È importante sottolineare che l'attivazione del sito di legame per le benzodiazepine favorisce sia l'interazione del GABA con il proprio sito che quello dei barbiturici con il rispettivo sito di legame. Allo stesso modo la presenza di una molecola di barbiturico sul sito di legame localizzato a livello del canale favorisce il legame sia del GABA che delle benzodiazepine con i rispettivi siti di riconoscimento. Al contrario, sia le benzodiazepine che i barbiturici riducono la capacità di modulatori negativi, quali la picrotossina e il TBPS, di interagire con il recettore GABA_A. Questi effetti a livello molecolare spiegano il sinergismo farmacologico tra benzodiazepine, barbiturici e steroidi.

Il recettore GABA_A è formato da più subunità

Il recettore GABA_A è un complesso eteromero formato da 5 subunità glicoproteiche appartenenti a diverse classi; sono stati identificati, nel cervello dei mammiferi, 19 diversi geni che codificano per le diverse subunità e sulla base della loro sequenza queste vengono distinte in: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π , ρ (1-3) (Figura 37.2). L'analisi delle sequenze mostra un elevato grado di omologia fra le tutte le subunità del recettore GABA_A, così come tra queste e quelle che compongono gli altri recettori appartenenti alla superfamiglia di recettori ionotropici "Cys-loop", che comprende il recettore nicotinico colinergico, il recettore della glicina e quello 5-HT₃ per la serotonina. L'eterogeneità delle subunità può essere ulteriormente aumentata mediante meccanismi di maturazione alternativa dell'mRNA i quali possono generale isoforme multiple come nel caso delle subunità γ_2 , presente come variante γ_{2L} (Long), che possiede una sequenza aggiuntiva di 8 amminoacidi localizzata in un loop citoplasmatico, e γ_{2S} (Short).

La distribuzione delle singole subunità nel SNC è estremamente differenziata, con alcune subunità che sono espresse in maniera diffusa nella maggior parte delle regioni cerebrali, come le subunità α_1 e β_2 , e altre che invece si ritrovano in aree più limitate e specifiche, come ad esempio la subunità α_6 , espressa esclusivamente nelle cellule granulari del cervelletto. Queste osservazioni hanno fatto ipotizzare che nel cervello siano presenti molteplici sottotipi di recettori formati dall'assemblaggio di combinazioni differenti di subunità. Molteplici studi in vitro di espressione di recettori ricombinanti hanno contribuito in maniera consistente a chiarire molti aspetti dei determinanti strutturali, funzionali e farmacologici dei differenti sottotipi di recettori GABA_A.

La combinazione più diffusa di questi recettori è rappresentata da un pentamero costituito da 2 subunità α , 2 subunità β , e 1 subunità γ_2 , che è anche quella necessaria per la formazione del sito di legame ad alta affinità delle benzodiazepine. In una minoranza di recettori, la subunità γ_2 può essere sostituita dalla subunità δ , ϵ o π , mentre la subunità β può essere rimpiazzata da una θ . Nel 1998, i membri del comitato preposto alla nomenclatura dei recettori GABA_A dell'International Union of

Pharmacology (IUPHAR) hanno quindi proposto una classificazione basata sulla loro composizione in subunità che è riassunta nella tabella 37.1.

Profilo farmacologico e composizione in subunità dei recettori nativi

Come si può notare dalla tabella, i diversi sottotipi di recettore GABA_A differiscono marcatamente anche per il loro profilo farmacologico. Dei vari sottotipi il più abbondante (circa il 45% della totalità dei recettori) nel SNC è quello $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, presente nella maggior parte delle aree cerebrali. Recettori $\alpha_2\beta_n\gamma_2$ e $\alpha_3\beta_n\gamma_2$ sono anche essi relativamente abbondanti: il primo è presente nei motoneuroni spinali e sulle cellule piramidali ippocampali, il secondo è presente su neuroni colinergici e monoaminergici dove sembra giocare un ruolo nel controllo del rilascio di neurotrasmettitori importanti nella fisiologia e nella farmacologia degli stati emozionali e del tono dell'umore. Gli altri sottotipi sono meno abbondanti. Una differente sottopopolazione di recettori GABA_A insensibili all'antagonista bicucullina, ai modulatori positivi (benzodiazepine, barbiturici, steroidi) nonché

TABELLA 37.1 Sottotipi di recettori GABA_A

Recettori GABA _A Composizione	Profilo farmacologico
$\alpha_1\beta_n\gamma_2$	Elevata affinità ed efficacia per benzodiazepine, imidazopiridine (zolpidem), pirazolopirimidine (zaleplon), 2-oxoquazepam e β -carboline
$\alpha_1\beta_n\gamma_3$	Come $\alpha_1\beta_n\gamma_2$, ma 400 volte meno sensibile a zolpidem e zaleplon
$\alpha_1\beta_n\gamma_1$	Come $\alpha_1\beta_n\gamma_3$, ma il flumazenil e il Ro 15-4513 hanno bassa affinità e agiscono da agonisti inversi come le β -carboline
$\alpha_2\beta_n\gamma_2$	Elevata affinità per benzodiazepine e β -carboline
$\alpha_2\beta_n\gamma_1$	Gli agonisti hanno un'affinità 2-20 volte minore che per $\alpha_2\beta_n\gamma_2$. L'affinità dello zolpidem è 5 volte maggiore ma la sua efficacia è molto minore. Insensibili all'antagonista flumazenil
$\alpha_3\beta_n\gamma_2$	Affinità per le benzodiazepine e le β -carboline simile ai recettori $\alpha_1\beta_n\gamma_2$. Azione intermedia (affinità 10 volte inferiore) per zolpidem e zaleplon
$\alpha_4\beta_n\gamma_2$	Insensibile alle classiche benzodiazepine, a zolpidem e zaleplon e molti altri agonisti. Affinità intermedia per le β -carboline (agonisti inversi). Flumazenil è agonista. Propofol e pentobarbital non hanno azione diretta
$\alpha_5\beta_1/\gamma_2$	Alta affinità per le classiche benzodiazepine. Insensibile alle imidazopiridine
$\alpha_5\beta_3\gamma_3$	Affinità simile a $\alpha_5\beta_1/\gamma_2$ a eccezione di triazolam e β -carboline (affinità 30 volte inferiore)
$\alpha_6\beta_1\gamma_2$	Insensibile a tutti i ligandi per i recettori alle benzodiazepine. Il flumazenil e il Ro 15-4513 diventano agonisti parziali e alcune β -carboline agonisti inversi diventano antagonisti
$\alpha_6\beta_2/\gamma_2$	Stesse proprietà di $\alpha_6\beta_1\gamma_2$. È selettivamente antagonizzato dalla furosamide
$\alpha_6\alpha_1\beta_2/\gamma_2$	Associa le proprietà di $\alpha_1\beta_n\gamma_2$ e $\alpha_6\beta_2/\gamma_2$

al baclofen (agonista GABA_B) è localizzata nei neuroni della retina. Questi recettori ionotropici accoppiati a un canale al Cl⁻ sono formati da complessi omomerici o eteromerici di subunità ρ_1 , ρ_2 e ρ_3 . Mentre la subunità ρ_1 è probabilmente espressa solo a livello della retina, la subunità ρ_2 è presente anche in diverse regioni del SNC. Le subunità ρ hanno 30-38% di omologia amminoacidica con le altre subunità del recettore GABA_A. Le subunità ρ non si assemblano con le subunità α , β , γ , ϵ , δ da cui differiscono anche per l'organizzazione molecolare dei siti di legame per i farmaci. Data la localizzazione preferenziale a livello della retina, potrebbero avere un ruolo nel controllo inibitorio delle risposte indotte dalla luce. Un problema importante, comunque, è quello di stabilire quali sono i sottotipi di recettori GABA_A che sono effettivamente espressi in vivo nel SNC (recettori nativi). A questo proposito, il comitato dello IUPHAR ha recentemente riesaminato tutti i dati sperimentali disponibili al riguardo e, applicando rigidi criteri, ha stilato la seguente lista di sottotipi di recettori GABA_A per i quali è certa l'espressione nel SNC in quanto recettori nativi:

$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	$\alpha_2\beta\gamma_2$	$\alpha_3\beta\gamma_2$	$\alpha_4\beta\gamma_2$	$\alpha_4\beta_2\delta$	$\alpha_4\beta_3\delta$
$\alpha_5\beta\gamma_2$	$\alpha_6\beta\gamma_2$	$\alpha_6\beta_2\delta$	$\alpha_6\beta_3\delta$	ρ	

I seguenti sottotipi recettoriali sono stati invece inseriti in una lista di "probabili" recettori nativi:

$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	$\alpha_1\beta\delta$	$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	$\alpha\beta_1\gamma/\alpha\beta_1\delta$
$\alpha\beta$	$\alpha_1\alpha_6\beta\gamma/\alpha_1\alpha_6\beta\delta$		

Altri sottotipi ancora, la cui esistenza non è suffragata da sufficienti dati sperimentali, non sono pertanto stati inseriti in nessuna di queste due liste. La conoscenza degli specifici sottotipi di recettori GABA_A espressi sulle cellule nervose in vivo è naturalmente di fondamentale importanza perché permette di focalizzare l'attenzione dei ricercatori su un numero più ristretto di recettori, così da valutarne meglio il ruolo fisiologico, ma anche da indirizzare la ricerca farmaceutica verso l'identificazione di molecole più selettive mirate a questi particolari sottotipi recettoriali.

Uno degli aspetti più affascinanti descritti recentemente dalla ricerca neurobiologica e neurofarmacologica sui recettori GABA_A è quello relativo alla straordinaria proprietà plastica che le cellule nervose utilizzano nel loro continuo tentativo di adattarsi alle variazioni dell'ambiente che le circonda. Questa plasticità è ottenuta attraverso modificazioni post-raduzionali (ad esempio, fosforilazioni) oppure attraverso l'assemblaggio di recettori di diversa composizione in subunità oppure nel cambiamento del numero e della localizzazione dei recettori (vedi CD: Approfondimento 37.2. *Modulazione fisiologica e farmacologica dell'espressione genica del recettore GABA_A*).

Recettori GABA_A extrasinaptici

■ L'inibizione tonica e fasica

Una delle acquisizioni più recenti e più interessanti nel campo dei recettori GABA_A è la scoperta che la trasmissione inibitoria GABAergica "rapida" può essere mediata da due meccanismi differenti. Infatti, si distingue una componente "fasica", mediata dai classici recettori GABA_A addensati nella membrana postsinaptica i quali vengono attivati dal GABA rilasciato dal terminale presinaptico, e una componente cosiddetta "tonica", mediata da recettori che sono localizzati ai margini o fuori dalla sinapsi e perciò chiamati peri- o extrasinaptici. La componente tonica dell'inibizione GABAergica è stata inizialmente descritta mediante metodiche elettrofisiologiche, ma l'esistenza dei recettori GABA_A extrasinaptici è stata successivamente dimostrata, mediante l'applicazione di tecniche di microscopia elettronica e di immunofluorescenza, su neuroni di diverse aree cerebrali come cervelletto, talamo, ippocampo e corteccia cerebrale. I recettori extrasinaptici differiscono dai recettori GABA_A sinaptici sia per la composizione in subunità sia per alcune proprietà funzionali. I recettori extrasinaptici più diffusi sono formati dalla subunità α_4 , $\beta_{2/3}$, e δ e si ritrovano nelle cellule granulari del giro dentato, nel talamo e nella corteccia, mentre nelle cellule granulari del cervelletto sono presenti i recettori $\alpha_6\beta_{2/3}\delta$. Nell'ippocampo è inoltre stata proposta l'espressione di recettori extrasinaptici $\alpha_5\beta\gamma_2$ e $\alpha\beta_1\delta$. In funzione del loro ruolo di mediatori della corrente tonica, i recettori extrasinaptici sono dotati di un'affinità elevata (~0,5 mM) per il GABA, che corrisponde all'incirca alla concentrazione presente nel liquido extracellulare, e mostrano una velocità di desensitizzazione molto ridotta. L'attivazione di questi recettori da parte del GABA, derivato dalla sua fuoriuscita dalla sinapsi (*spillover*), quindi genera una corrente continua (tonica) iperpolarizzante che non si inattiva. Si è calcolato che la quantità media di carica (Cl⁻) trasferita nell'unità di tempo attraverso i canali associati ai recettori extrasinaptici è oltre 3 volte quella trasferita mediante i recettori sinaptici, suggerendo che l'inibizione tonica rappresenti un meccanismo particolarmente efficiente per il controllo continuo dello stato di eccitabilità delle cellule nervose. È importante, inoltre, ricordare come i recettori GABA_A extrasinaptici $\alpha_4\beta_{2/3}\delta$ e $\alpha_6\beta_{2/3}\delta$ siano particolarmente sensibili all'azione modulatrice positiva dei neurosteroidi. Essendo sintetizzati e secreti anche dalle cellule del SNC, questi ormoni possono contribuire ulteriormente, attraverso la loro azione modulatrice sulla corrente tonica, alla regolazione fine dell'eccitabilità neuronale. Il ruolo dei recettori GABA_A extrasinaptici nell'azione dell'etanolo verrà discusso più avanti. Si ricorda infine che i recettori extrasinaptici possono essere attivati dall'agonista preferenziale THIP (4,5,6,7-tetraidrossiazolo-[5,4-c]-piridina-3-olo, gaboxadolo) e inibiti da elevate concentrazioni di bicucullina o picrotossina.

Farmacologia della trasmissione GABAergica

L'evidenza che i farmaci d'elezione nella terapia dei disturbi d'ansia, dei disturbi del sonno e di alcune patologie convulsive, quali le benzodiazepine e i barbiturici, hanno specifici siti di legame a livello del recettore-canale GABA_A, con la successiva scoperta che anestetici generali, steroidi, ed etanolo potenziano l'azione sinaptica del GABA ha permesso di chiarire il ruolo farmacologico che i recettori GABA_A svolgono nel SNC dei mammiferi.

Le benzodiazepine

■ Differenti siti di legame per le benzodiazepine

Le benzodiazepine hanno siti di legame sul recettore GABA_A ma distinti dal sito di legame per il GABA. L'attivazione del sito di legame delle benzodiazepine facilita l'interazione del GABA con i propri siti recettoriali: fenomeno che si traduce in un aumento della frequenza dell'apertura del canale in presenza di GABA. Pertanto, le benzodiazepine, pur interagendo con siti di legame diversi da quelli del GABA, possono modulare positivamente la trasmissione GABAergica (modulazione allosterica). L'Unione Internazionale di Farmacologia (IUPHAR) ha suggerito nel 1998 (Barnard et al.) una nuova nomenclatura dei sottotipi di recettori GABA_A e dei siti di legame delle benzodiazepine (Tabella 37.1). Tenendo conto della eterogeneità dei recettori GABA_A e dell'evidenza che i siti di legame per le benzodiazepine (ai quali si legano anche molecole non benzodiazepiniche come imidazopiridine, pirazolopirimidine, ciclopirroloni, β_α-carboline ecc.) sono presenti soprattutto nella subunità α, oggi è generalmente accettata una nomenclatura dei recettori centrali basata sull'affinità dei vari ligandi per i siti di legame localizzati sulle differenti isoforme della subunità α. Questi recettori mediano gli effetti farmacologici classici delle benzodiazepine.

■ TPSO o recettore periferico

Il sito di legame delle benzodiazepine localizzato sulle cellule della glia e su altri tipi cellulari in diversi organi quali fegato, rene, testicoli, polmoni, ovaio, surrene, inizialmente chiamato recettore periferico per le benzodiazepine e recentemente rinominato "traslocator protein 18 kDa" (TPSO), non ha alcuna relazione funzionale con i vari sottotipi di recettori GABA_A presenti nel SNC (Tabella 37.2). Il ruolo fisiologico e farmacologico della proteina TPSO non è stato ancora completamente definito. La proteina TPSO è localizzata principalmente nella membrana mitocondriale delle cellule che sintetizzano steroidi comprese quelle del sistema nervoso centrale e periferico, dove, in concerto con la proteina Star (*Steroidogenic acute regulatory protein*), svolge un ruolo chiave nella traslocazione del colesterolo all'interno del mitocondrio (Tabella 37.2).

■ Sottotipi di recettori GABA_A mediano gli effetti delle benzodiazepine

Il ruolo di alcuni sottotipi di recettori GABA_A è stato chiarito solo di recente grazie all'utilizzo della strategia del knockin genico (Figura 37.3). Mediante questo approccio sperimentale, il sito di riconoscimento delle benzodiazepine è stato reso diazepam-insensibile apportando una mutazione puntiforme nelle diverse isoforme "diazepam-sensibili" (α₁, α₂, α₃, α₅) della subunità α. Questa mutazione consiste nel sostituire un residuo di istidina (H) in posizione 101 (numerazione riferita alla subunità α₁) con un residuo di arginina (R) [α₁(H101R), α₂(H101R) α₃(H126R) e α₅(H105R)]. Le linee di topi generate, ciascuna delle quali portatrice della mutazione su una singola subunità α che rende i recettori nei quali è assemblata "diazepam-insensibili", venivano testate prevedendo che, se un dato effetto comportamentale delle benzodiazepine è annullato o

TABELLA 37.2 Traslocator protein 18 kDa (TPSO)

	SNC	Organi periferici
Distribuzione	Cellule gliali	Surrene, testicoli, ovaio, polmone, rene, fegato, cuore, muscoli scheletrici, piastrine, linfociti, globuli rossi
Localizzazione subcellulare	Prevalentemente mitocondriale	
Struttura molecolare	Complesso eteromero costituito da tre differenti subunità, una subunità di 18 kDa, che contiene il sito di legame, associata con due proteine aventi peso molecolare di 32 kDa (canale anionico a dipendenza di voltaggio, VDAC) e 30 kDa (trasportatore di nucleotidi, ANT)	
Ligandi sintetici	Benzodiazepine: diazepam, flunitrazepam, 4-clorodiazepam Derivati imidazopiridinici: alpidem, zolpidem, serie CB (34, 50, 54) Derivati isochinolinici: PK 11195 Derivati aril-indolici: serie FGIN 1-X	
Ligandi endogeni	Colesterolo, porfirine, antraline <i>Diazepam Binding Inhibitor</i> (DBI), peptide di 104 amminoacidi, la sua attività biologica è dovuta al frammento (TTN) compreso tra gli amminoacidi 17-50	
Ruolo fisiologico	I recettori PBR non sono funzionalmente legati ai recettori GABA _{A,B} e non mediano gli effetti centrali delle benzodiazepine. L'attivazione dei PBR si traduce nella induzione della steroidogenesi attraverso il trasporto del colesterolo all'interno del mitocondrio e la sua conversione in pregnenolone che trasloca nel reticolo endoplasmatico dove viene convertito in progesterone. Due metaboliti del progesterone modulano con elevata efficacia la funzione dei recettori GABA _A . I PBRs hanno inoltre un ruolo nei meccanismi molecolari coinvolti nella crescita tumorale, nella respirazione mitocondriale, nella gliosi, nella risposta infiammatoria, nella rigenerazione nervosa, nella secrezione di insulina, nell'influsso di Ca ²⁺ nel trasporto anionico e nell'apoptosi	

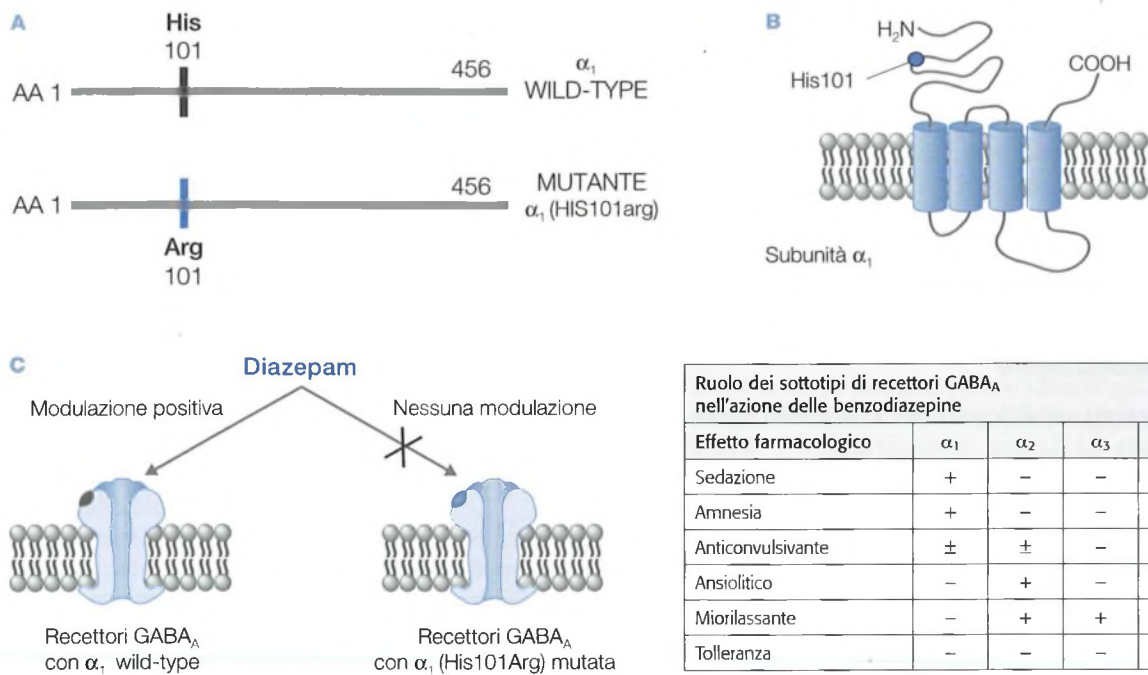


FIGURA 37.3 Diagramma che descrive la mutazione sito-specifica introdotta nelle subunità α₁ del recettore GABA_A di cui sono portatori i topi knockin di una linea specifica. **(A)** La mutazione puntiforme è stata introdotta a livello del cDNA codificante per la subunità α₁, e determina la sostituzione dell'amminoacido istidina in posizione 101 con un residuo di arginina. Come è illustrato in **(B)**, l'His101 è localizzata nel dominio N-terminale extracellulare della subunità α₁ ed è cruciale per il sito di legame delle benzodiazepine. **(C)** I recettori GABA_A contenenti la subunità α₁ (His101Arg) mutata non sono in grado di legare il diazepam per cui sono insensibili a questa benzodiazepina. La stessa mutazione è stata inoltre effettuata sulle isoforme α₂, α₃, e α₅ della subunità α, generando così diverse linee di topi knockin. Nella tabella sono riportati gli effetti farmacologici del diazepam mediati dalle specifiche popolazioni di recettori GABA_A contenenti differenti subunità α.

comunque notevolmente ridotto, lo stesso effetto può correlarsi con lo specifico sottotipo recettoriale. Questi studi hanno dimostrato che i topi knockin α₁(H101R) erano resistenti all'effetto sedativo indotto dalla somministrazione di diazepam, suggerendo che questo effetto è mediato dai recettori contenenti la subunità α₁. Tuttavia in questi topi la somministrazione di diazepam induceva un'alterazione del EEG simile a quella osservata nel topo wild-type. Questo modello sperimentale ha così permesso di distinguere l'effetto sedativo da quello delle alterazioni del pattern del sonno fisiologico indotte dalle benzodiazepine. La mutazione della subunità α₁(H101R) riduce parzialmente l'effetto anticonvulsivante del diazepam nel test del pentilentetrazolo, pertanto questo sottotipo di recettore GABA_A potrebbe contribuire a mediare l'effetto anticonvulsivante. La stessa mutazione (H101R) sulla subunità α₂ ha invece permesso di scoprire che i recettori GABA_A contenenti questa subunità mediano l'effetto ansiolitico delle benzodiazepine. Infatti, nei topi knockin α₂(H101R) il diazepam non è stato capace di indurre effetto anticonflitto-ansiolitico. La subunità α₂ media anche l'azione miorilassante del diazepam. Più di recente, la strategia dei topi knockin ha permesso di dimostrare che i topi knockin α₅(H105R) non sviluppano tolleranza al diazepam, suggerendo che i recettori contenenti la subunità α₅ potrebbero avere un ruolo importante nei fenomeni a lungo termine delle

benzodiazepine e che la stessa subunità α₅ potrebbe avere un ruolo importante in alcuni processi mnemonici di apprendimento (Figura 37.3).

Farmaci attivi sul canale al Cl⁻

I barbiturici potenziano l'azione del GABA interagendo con siti recettoriali specifici localizzati sulla superficie luminare del canale ionico del recettore GABA_A: l'occupazione di questi siti ha come effetto principale quello di aumentare il tempo medio di apertura del canale anche indipendentemente dalla presenza del neurotrasmettitore (Figura 37.4). È utile ricordare che le benzodiazepine modulano la funzione del canale attraverso la facilitazione dell'azione del GABA, in assenza del quale perdono completamente di efficacia. Gli effetti di depressione delle attività del SNC sono autolimitanti (se la sinapsi è inibita al punto da non liberare GABA, l'effetto delle BDZ scompare), di entità variabile tra aree cerebrali (in funzione del sottotipo di recettore espresso) e, in genere, non conducono a morte per depressione respiratoria. Al contrario i barbiturici sono in grado di attivare un flusso di Cl⁻ attraverso il recettore GABA_A anche indipendentemente dalla presenza del neurotrasmettitore. La loro somministrazione si traduce in una attivazione funzionale di tutte le sinapsi GABAergiche centrali con depressione generalizzata, dose-dipendente del SNC con blocco dei centri respiratori e morte.

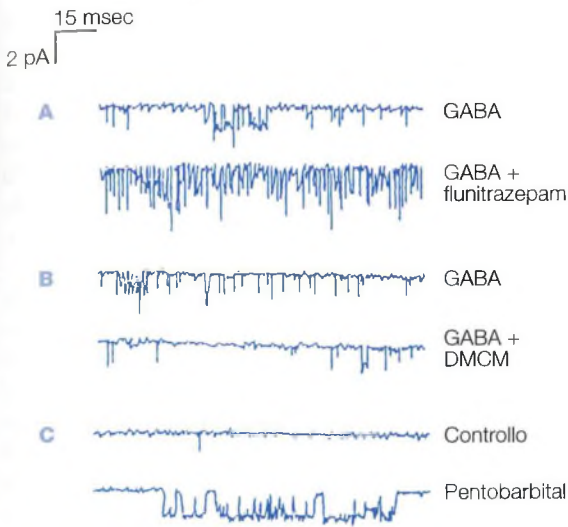


FIGURA 37.4 Correnti al Cl^- attivate dal GABA e da vari modulatori del recettore GABA_A misurate su singoli canali al Cl^- su neuroni corticali di ratto (**A** e **B**) o neuroni spinali di ratto (**C**) con il metodo del patch-clamp. **A.** La corrente attivata dal GABA ($1 \mu\text{M}$) è potenziata dalla benzodiazepina flunitrazepam ($1 \mu\text{M}$) attraverso un aumento della frequenza di apertura del canale. **B.** La corrente attivata dal GABA ($1 \mu\text{M}$) è inibita dalla β -carbolina DMCM ($5 \mu\text{M}$) mediante una diminuzione della frequenza di apertura del canale. **C.** Corrente attivata dal pentobarbital ($150 \mu\text{M}$) in assenza di GABA. I barbiturici, come il pentobarbital, infatti, sono in grado di promuovere l'apertura del canale al Cl^- accoppiato al recettore GABA_A anche in assenza dell'agonista, e l'effetto è quello di un aumento del tempo di apertura del canale senza alterare la frequenza di questo evento.

Steroidi e recettori GABA_A

Steroidi attivi sul SNC modulano l'attività del recettore GABA_A

L'evidenza che gli ormoni steroidei hanno attività biologica a livello del SNC è stata fornita da Selye già nel 1941 con la dimostrazione che alcuni di questi composti possiedono effetti sedativi, anestetici. La ricerca più recente ha permesso di approfondire queste osservazioni dimostrando che alcuni ormoni steroidei possiedono anche effetti anticonvulsivanti e ansiolitici e suggerendo un loro importante ruolo nel condizionare il comportamento e l'adattamento allo stress. La rapidità con la quale insorgono questi effetti suggerisce che siano mediati da un'azione diretta di questi ormoni su specifici recettori di membrana escludendo un meccanismo genomico. Infatti, due metaboliti del progesterone, allopregnanolone e allotetraidrodiossiccorticosterone, sono in vitro e in vivo tra i più potenti ed efficaci modulatori positivi dei flussi di Cl^- associati ai recettori GABA_A . Studi elettrofisiologici su recettori clonati e nativi hanno dimostrato che questi composti facilitano la trasmissione GABAergica aumentando la frequenza e la durata di apertura del canale allo ione Cl^- associato al recettore GABA_A .

Studi recenti hanno identificato due specifici siti di legame a livello del complesso recettoriale GABA_A . Il primo è localizzato sulla subunità α e media la capacità degli

steroidi di potenziare l'attività dello ionoforo al Cl^- attraverso una facilitazione allosterica dell'azione del GABA; il secondo è localizzato in corrispondenza delle regioni di interfaccia tra la subunità α e quella β e, quando viene attivato, la sua attivazione modula direttamente la funzione del canale al Cl^- così come fanno i barbiturici. Entrambi i siti sono ben conservati tra le diverse isoforme delle due subunità. La diversa composizione in subunità del recettore può inoltre alterare l'efficacia di alcuni steroidi. In generale, i recettori ricombinanti contenenti le subunità α_1 , α_3 e α_6 in combinazione con β_1 e γ_2 sono risultati più sensibili all'azione dell'allopregnanolone rispetto ai recettori ricombinanti contenenti le subunità α_2 , α_4 e α_5 . Al contrario, l'isoforma della β non ha alcun effetto sulla sensibilità del recettore ai neurosteroidi, mentre il potenziamento delle correnti Cl^- GABA-stimate da parte dell'allopregnanolone è maggiore nelle combinazioni contenenti la γ_1 . In topi mutanti privi della subunità δ gli effetti comportamentali dell'anestestico alfaxalone e del ganaxalone, un analogo sintetico dell'allopregnanolone, sono marcatamente ridotti, dimostrando l'importanza di tale subunità nell'azione di questi composti. Infine, i recettori contenenti la subunità ϵ e gli omomerici formati dalla subunità ϵ sono relativamente insensibili all'azione dei neurosteroidi.

Una scoperta fondamentale per capire il ruolo fisiologico degli ormoni steroidei è data dall'evidenza che nel cervello, alcune cellule gliali (soprattutto gli oligodendrociti), sono capaci di sintetizzare steroidi "ex novo" a partire dal colesterolo, e i neuroni di metabolizzare precursori (pregnanolone, progesterone) che provengono dalla periferia. La dimostrazione che il SNC sintetizza steroidi e contiene a livello di membrana "bersagli" funzionali per una rapida azione di questi ormoni ha aperto un nuovo entusiasmante capitolo nello studio della farmacologia degli ormoni steroidei e della funzione dei recettori GABA_A . Gli steroidi prodotti per sintesi dal cervello, quali il progesterone e l'allopregnenolone, sono stati denominati *neurosteroidi*, mentre gli steroidi sintetizzati in organi periferici (ovaio, surrene) e comunque attivi a livello centrale sono stati denominati *steroidi neuroattivi*. È di notevole importanza ricordare che alcuni derivati steroidei solfati (pregnenolone solfato, deidroepiandrosterone solfato), al contrario dei metaboliti del progesterone, inibendo la frequenza di apertura del canale allo ione Cl^- , modulano in maniera negativa la funzione del recettore GABA_A . Infatti la somministrazione di questi derivati a topi e ratti induce effetti ansiogenici e proconvulsivanti. Quest'ultima scoperta ha una notevole importanza in quanto dimostra l'esistenza di modulatori allosterici endogeni capaci di attivare o inibire il recettore GABA_A come fanno i farmaci ansiolitici (agonisti) e i farmaci ansiogenici (agonisti inversi). Questi ormoni sarebbero una componente fondamentale dei meccanismi fisiologici rilevanti nel controllo dell'attività delle aree cerebrali coinvolte nella regolazione delle emozioni e più in generale dell'eccitabilità neuronale.

È rilevante ricordare che il progesterone e i suoi metaboliti subiscono drammatiche fluttuazioni fisiologiche

durante il ciclo mestruale, la gravidanza e la menopausa. Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato che in queste condizioni questi ormoni hanno un ruolo cruciale nel controllare l'espressione genica e quindi la sintesi dei recettori GABA_A. Pertanto alterazioni nella regolazione della secrezione periferica o centrale di questi ormoni possono determinare modificazioni nel pattern di espressione dei recettori GABA_A e quindi modificare la soglia di eccitabilità delle cellule nonché l'efficacia dei farmaci attivi su questi recettori.

Anestetici generali ed etanolo

Gli anestetici generali potenziano la funzione dei recettori GABA_A

Gli anestetici generali sono una classe di farmaci, notevolmente eterogenei fra loro dal punto di vista della struttura chimica, il cui preciso meccanismo d'azione rimane ancora sconosciuto. Sebbene numerose evidenze abbiano suggerito in passato che gli anestetici generali esercitino un'azione aspecifica a livello della componente lipidica delle membrane neuronali (la loro potenza anestetica è ben correlata con il loro coefficiente di ripartizione olio/acqua, $P_{o/w}$), negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato in maniera convincente che alcune proteine di membrana (recettori e canali ionici) rappresentano un bersaglio primario per l'azione farmacologica degli anestetici generali. Tra queste proteine di membrana, il recettore GABA_A si dimostra particolarmente sensibile all'azione degli anestetici, i quali, a concentrazioni clinicamente efficaci, ne aumentano la funzione. Si tratta in genere di un'azione modulatoria marcata, caratterizzata da un'efficacia molto superiore a quella mostrata dalle benzodiazepine ansiolitiche e ipnotiche. A differenza di quest'ultima classe di farmaci, molti anestetici generali, in particolare quelli endovenosi, hanno anche la capacità, a concentrazioni superiori a quelle efficaci nel modulare le risposte al GABA, di attivare direttamente il canale al Cl⁻ associato al recettore anche in assenza di GABA, un'azione che viene chiamata GABA-mimetica.

Lo studio di recettori GABA_A ricombinanti in diversi sistemi di espressione ha permesso di dimostrare inequivocabilmente che l'azione di alcuni anestetici è fortemente dipendente da specifiche subunità che compongono il recettore stesso. Infatti, è stato dimostrato che l'azione modulatoria e GABA-mimetica del propofol e dell'etomidato è fortemente dipendente dalle subunità del recettore GABA_A. Questa scoperta ha favorito successive ricerche che, con l'utilizzo di mutazioni sito-specifiche del cDNA che codifica per le diverse subunità del recettore GABA_A, hanno permesso di individuare a livello della subunità α_1 , due aminoacidi (Ser270 nel dominio M2, e Ala291 nel dominio M3), e nella subunità β , un aminoacido (Ser265 nel dominio M2), che sono fondamentali per gli effetti dell'isoflurano ed enflurano, ma anche dell'etanolo. È ipotizzabile quindi, che questi aminoacidi partecipino alla formazione di un sito o "tasca" idrofobica, localizzata fra i due segmenti transmembrana M2 e M3, che è deputato ad accogliere queste molecole e che media

i loro effetti sulla funzione del recettore. In aggiunta, è stato dimostrato che lo stesso aminoacido sulla subunità β_1 gioca un ruolo critico per gli anestetici endovenosi etomidato e propofol. Infatti, l'azione dell'etomidato e del propofol è marcatamente superiore sui recettori ricombinanti contenenti la subunità β_2 o la β_3 , rispetto a quella misurata sui recettori contenenti la β_1 . Le subunità β_2/β_3 contengono in posizione 265 un residuo di asparagina, mentre l'equivalente aminoacido nella β_1 è una serina. Sfruttando questa selettività recettoriale si è cercato di chiarire il ruolo delle due isoforme della subunità β sensibili (β_2 e β_3) all'azione degli anestetici. Recentemente sono state generate delle linee di topi knockin portatori di una mutazione puntiforme sulla subunità β_2 (N265S) in un caso, e sulla subunità β_3 (N265M) in un altro. I risultati con i topi knockin β_2 (N265S) dimostrano che i recettori contenenti la subunità β_2 mediano solo gli effetti sedativi indotti da concentrazioni subanestetiche di questi composti, in quanto l'effetto anestetico era ancora presente in questi animali. Al contrario, nei topi knockin β_3 (N265M), l'effetto anestetico dell'etomidato e del propofol veniva marcatamente ridotto, suggerendo che questo effetto è mediato principalmente dai recettori GABA_A contenenti la subunità β_3 . Recenti studi elettrofisiologici effettuati in diversi nuclei talamici hanno, inoltre, dimostrato che le correnti toniche, in quell'area mediate da recettori extrasinaptici $\alpha_4\beta_3\delta$, sono potenziate in maniera robusta dall'isoflurano a concentrazioni clinicamente rilevanti. Poiché i nuclei talamici sono importanti nella regolazione del sonno e il sistema GABAergico in quest'area gioca un ruolo fondamentale nel controllo degli stati sonno-veglia, si può ritenere che l'aumento dell'inibizione tonica indotto dall'isoflurano in quest'area possa contribuire al suo effetto anestetico generale.

Anche l'etanolo potenzia la trasmissione GABAergica

L'alcol etilico o etanolo potenzia la funzione dei recettori GABA_A ed è capace di produrre uno spettro di effetti farmacologici che in parte è sovrapponibile a quello delle benzodiazepine e dei barbiturici. Gli effetti dell'etanolo, inoltre, sono potenziati dagli agonisti GABAergici, come il muscimolo, e ridotti dagli antagonisti come la bicucullina. Numerose ricerche sperimentali dimostrano che concentrazioni ansiolitiche-sedative (5-20 mM) di etanolo facilitano con differente efficacia la funzione dei recettori GABA_A in cellule nervose di diverse aree cerebrali. In particolare, si ritiene che mentre i neuroni cerebellari e spinali siano particolarmente sensibili all'etanolo, quelli ippocampali siano più resistenti. Una delle possibili ragioni di questa differenza potrebbe essere correlata ai diversi sottotipi di recettori GABA_A espressi nelle diverse regioni o in diverse sottopopolazioni neuronali. A tal proposito, è stato recentemente dimostrato che i recettori ricombinanti $\alpha_4\beta_3\delta$ e $\alpha_6\beta_3\delta$, che sui neuroni sono localizzati esclusivamente a livello extrasinaptico, sono modulati positivamente da concentrazioni di etanolo particolarmente basse (3-10 mM) rispetto a quelle necessarie (>50 mM) per potenziare

i recettori ricombinanti $\alpha_1\beta_2\gamma_2$. Tale risultato è stato poi confermato in esperimenti su fettine di cervello di roditori in cui è stato osservato che le correnti toniche mediate da recettori extrasinaptici nelle cellule granulari del giro dentato (che esprimono recettori $\alpha_4\beta_{2/3}\delta$) sono potenziate da basse (30 mM) concentrazioni di etanolo. Questi risultati suggerirebbero che i recettori GABA_A extrasinaptici possano essere responsabili dell'effetto ansiolitico dell'etanolo, mentre i recettori sinaptici, meno sensibili a questa sostanza, possano mediarne gli effetti depressivi più marcati, come la sedazione e l'incoordinazione motoria, così come gli effetti tossici. Tuttavia, la rilevanza fisiologica di queste osservazioni non è ancora stata chiarita in modo definitivo.

Recenti studi elettrofisiologici effettuati in preparati cerebrali di roditori hanno messo in evidenza in maniera convincente un ulteriore meccanismo attraverso il quale l'etanolo può esercitare un'azione di modulazione della funzione delle sinapsi GABAergiche inibitorie. Letanolo, a concentrazioni di rilevanza farmacologica (25-60 mM), è in grado di determinare un aumento marcato della probabilità di rilascio di GABA dai terminali presinaptici, con il risultato di una maggiore stimolazione dei recettori GABA_A postsinaptici e quindi del segnale inibitorio. Studi successivi suggeriscono che questa azione presinaptica dell'etanolo possa coinvolgere un aumento del rilascio di Ca²⁺ dal compartimento citoplasmatico delle terminazioni, e che questo effetto richiederebbe l'attivazione delle vie di trasduzione adenilato ciclasa/PKA- e PLC/IP₃/PKC-dipendenti.

Letanolo può esercitare un'azione modulatoria sui recettori GABA_A attraverso un meccanismo alternativo indiretto, che coinvolge gli steroidi neuroattivi, essi stessi potenti ed efficaci modulatori endogeni dei recettori GABA_A. Letanolo, infatti, somministrato nell'animale da esperimento, induce un marcato innalzamento dei livelli plasmatici e cerebrali di questi ormoni, compreso l'allopregnanolone e il THDOC. Tale aumento della concentrazione di steroidi neuroattivi a livello delle sinapsi GABAergiche determinerebbe quindi il potenziamento della funzionalità del recettore GABA_A, soprattutto quella dei recettori extrasinaptici che sono più sensibili a questi steroidi. Questa azione dell'etanolo risulta mediata dall'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, anche se studi più recenti suggeriscono che non può essere esclusa anche un'azione neurosteroidogenica diretta sulle cellule nervose. In accordo con questo meccanismo, inoltre, la somministrazione di etanolo induce un rapido e marcato aumento dell'espressione della proteina StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*), capace di regolare la traslocazione del colesterolo all'interno del mitocondrio, sia in organi periferici come il surrene, sia nel cervello. La dimostrazione che la finasteride, un inibitore della biosintesi di neurosteroidi, previene l'aumento delle concentrazioni di tali ormoni a livello cerebrale indotto dall'etanolo nonché di alcuni degli effetti farmacologici di questa sostanza, rafforza l'ipotesi del ruolo cruciale degli steroidi neuroattivi quali mediatori delle azioni dell'etanolo a livello centrale.

Recettori GABA_B

■ Il recettore GABA_B è accoppiato a proteine G

Nel 1980, studiando il meccanismo GABAergico di regolazione del rilascio dei neurotrasmettitori in diverse preparazioni di cervello di ratto, Bowery e collaboratori mostrarono che l'effetto inibitorio del GABA sul rilascio di noradrenalina evocato dal K⁺ era mediato da recettori dotati di proprietà farmacologiche del tutto differenti dalle classiche risposte GABAergiche. Infatti, l'effetto del GABA non era bloccato dalla bicucullina, antagonista competitivo dei classici recettori per il GABA, mentre era mimato in maniera stereo-selettiva dal baclofen (β -para-clorofenil-GABA), uno spasmolitico usato in clinica, e non era dipendente dagli ioni Cl⁻. Studi successivi di *binding* recettoriale hanno fornito l'evidenza diretta di siti distinti di riconoscimento del baclofen sulle membrane neuronali centrali. Il termine di recettore GABA_B fu quindi introdotto per distinguere questo sito da quello bicucullina-sensibile che venne pertanto designato come GABA_A.

A livello centrale, i recettori GABA_B sono localizzati sia sui neuroni sia sulle cellule gliali. In periferia, sono localizzati sulle cellule muscolari lisce, nel fegato e in altri tessuti. Nel cervello, i recettori GABA_B hanno una distribuzione molto simile a quella dei recettori GABA_A. A livello subcellulare, questi recettori si ritrovano espressi a livello presinaptico, sia sui terminali GABAergici (autorecettori) sia su quelli non-GABAergici (eterorecettori), così come sulle membrane postsinaptiche, su dendriti e soma cellulare. I principali ruoli funzionali dei recettori GABA_B comprendono il controllo inibitorio della liberazione di numerosi neurotrasmettitori, GABA incluso, e a livello postsinaptico sono responsabili della generazione della componente tardiva e lenta dei potenziali postsinaptici inibitori.

La clonazione molecolare del recettore GABA_B, pubblicata nel 1997, ha confermato la tipica struttura molecolare comune a tutti i recettori accoppiati a proteine G, comprendendo 7 regioni transmembrana, e un segmento N-terminale extracellulare particolarmente sviluppato presente anche nei recettori metabotropici per il glutammato (Figura 37.5). I recettori GABA_B e per il glutammato appartengono alla stessa classe C di recettori metabotropici. Sono state identificate due proteine recettoriali strettamente correlate, denominate GABA_{B1} e GABA_{B2}. Queste sono formate da circa 950 amminoacidi e condividono circa il 35% di identità e circa il 50% di similitudine. Inoltre, la proteina GABA_{B1} è presente nel cervello dei mammiferi in due isoforme, GABA_{B1a} e GABA_{B1b}; queste sono codificate dallo stesso gene e vengono originate da un processo alternativo di trascrizione. Le due proteine infatti differiscono fra loro in quanto la proteina GABA_{B1a} possiede due regioni "sushi" nel dominio N-terminale extracellulare che mancano nella proteina GABA_{B1b}.

■ **La struttura funzionale del recettore GABA_B è rappresentata dall'eterodimero GABA_{B1} e GABA_{B2}**

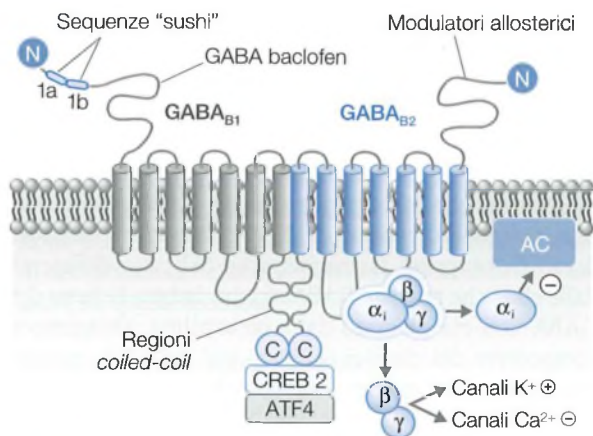


FIGURA 37.5 Rappresentazione schematica del recettore GABA_B. Questo è formato da un eterodimero composto dalle subunità GABA_{B1} e GABA_{B2}, che interagiscono tra loro mediante i rispettivi domini carbossi-terminali in una struttura chiamata coiled-coil. Il GABA e gli agonisti del recettore GABA_B (baclofen) si legano sulla regione amminoterminale della subunità GABA_{B1}, mentre la subunità GABA_{B2} è responsabile dell'accoppiamento funzionale con la proteina G e del legame con i modulatori allosterici. L'attivazione del recettore GABA_B induce l'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi, inibizione della funzione dei canali al Ca²⁺ (a livello presinaptico) e aumento della conduttanza al K⁺ (a livello postsinaptico). Sulle regioni C-terminali possono, inoltre, interagire diversi fattori di trascrizione come CREB2 e ATF4, che modulano l'espressione dei geni specifici. La proteina GABA_{B1} ha all'N terminale una caratteristica sequenza, denominata sushi, che potrebbe essere responsabile della localizzazione subcellulare del recettore.

Studi di espressione di recettori GABA_B ricombinanti hanno permesso di dimostrare che la struttura funzionale del recettore è rappresentata dall'eterodimero GABA_{B1}-GABA_{B2}, il primo esempio di tale complesso molecolare fra tutti i recettori metabotropici conosciuti. Le due subunità del recettore GABA_B interagiscono mediante i loro domini C-terminali intracellulari attraverso regioni ad α -elica parallele chiamate *coiled-coil*. In tale eterodimero, la subunità GABA_{B1} è deputata a formare il sito di legame per il GABA e per gli agonisti/antagonisti, mentre la subunità GABA_{B2} ha la funzione di accoppiarsi alla proteina G (Figura 37.5). È interessante come l'interazione fra le due proteine determini anche la localizzazione finale del complesso recettoriale sulla membrana cellulare. Infatti, in topi knockout per la proteina GABA_{B2}, la subunità GABA_{B1} non riesce a raggiungere la membrana e resta confinata nel reticolo endoplasmatico. Studi dettagliati suggeriscono che la subunità GABA_{B1} possiede una sequenza di riconoscimento e di interazione (RSRR) per particolari proteine di rivestimento (COPI) che favorirebbe la ritenzione della proteina in questo comparto citoplasmatico; questa sequenza, però, verrebbe "mascherata" in presenza della proteina GABA_{B2} favorendo quindi il trasporto dell'eterodimero verso la membrana cellulare.

L'interazione del GABA, o del baclofen, con il recettore GABA_B eterodimerico attiva una proteina G appartenente

alla famiglia di proteine G_{ai}/G_{oa} sensibili alla tossina della pertosse. I sistemi effettori del recettore GABA_B comprendono l'adenilato ciclasi e i canali del Ca²⁺ e del K⁺. In particolare, l'attivazione del recettore GABA_B provoca una inibizione della funzione dell'adenilato ciclasi con la conseguente riduzione della formazione di cAMP e dei livelli di fosforilazione PKA-dipendente. A livello presinaptico, l'attivazione dei recettori GABA_B provoca, attraverso il dimero $\beta\gamma$ della proteina G (G _{$\beta\gamma$}), una diminuzione della conduttanza dei canali voltaggio-dipendenti del Ca²⁺ di tipo N (Ca_v2,2) o P/Q (Ca_v2,1), entrambi espressi a livello presinaptico in corrispondenza delle zone attive di esocitosi vescicolare. La riduzione dell'influsso di ioni Ca²⁺ sembra essere il principale meccanismo capace di inibire il rilascio di neurotrasmettitori. La modulazione positiva della conduttanza del K⁺ attraverso canali del K⁺ *inward rectifier* di tipo Kir-3, mediato dalla G _{$\beta\gamma$} , è invece associata principalmente ai recettori GABA_B localizzati a livello postsinaptico. L'aumento della permeabilità della membrana al K⁺, e quindi del suo efflusso dalla cellula, determina un effetto iperpolarizzante e di *shunting* (riduzione della resistenza d'ingresso delle membrane) tale da smorzare i potenziali postsinaptici eccitatori, abbassando la soglia di eccitabilità della stessa cellula.

La funzione delle proteine GABA_{B1a} e GABA_{B1b} è stata studiata utilizzando topi modificati geneticamente in modo da esprimere selettivamente solo una delle due isoforme. Gli studi morfologici ed elettrofisiologici su questi animali sembrano indicare che le due isoforme possano svolgere funzioni separate in virtù di una loro localizzazione differenziale a livello subcellulare. Nelle cellule piramidali dell'ippocampo e della neocorteccia, infatti, a livello presinaptico l'isoforma GABA_{B1a} è presente in maniera selettiva sui terminali glutammatergici, mentre sui terminali degli interneuroni GABAergici si ritrovano entrambe le isoforme. A livello postsinaptico, sembra che l'isoforma GABA_{B1b} sia selettivamente localizzata sulla membrana delle spine dendritiche prospiciente alla sinapsi eccitatoria glutammatergica; entrambe le isoforme invece sarebbero espresse nella membrana del tronco dendritico, probabilmente come recettori GABA_B extrasinaptici. È stata perciò avanzata l'ipotesi che una differenziazione funzionale dei recettori GABA_B possa aver origine, almeno in alcune aree cerebrali, dall'espressione selettiva delle proteine GABA_{B1a} e GABA_{B1b} a livello subcellulare. A tal proposito, si ritiene che i due domini "sushi", presenti nella proteina GABA_{B1a}, ma non nella GABA_{B1b}, possano contribuire a regolare la localizzazione subcellulare di queste proteine. Poiché tali regioni "sushi" sono elementi ben conservati deputati a interazioni proteina-proteina, è possibile che essi servano a consentire il legame della isoforma GABA_{B1a} con altre proteine di adesione extracellulari necessarie per la localizzazione a livello assonale e/o dendritico. Una di tali proteine sarebbe la fibulina-2, la cui funzione nel contesto dei recettori GABA_B però non è stata ancora chiarita.

Diversi laboratori hanno osservato che la subunità GABA_{B1} può interagire, a livello della regione *coiled-coil* nel dominio C-terminale intracellulari, con alcuni fattori di

trascrizione, come CREB2 e ATF4. A seguito dell'attivazione del recettore è stata osservata sia la traslocazione di questi fattori nel nucleo cellulare sia l'espressione di geni *reporter* sensibili a CREB2/ATF4. Questi dati quindi dimostrano per la prima volta l'interazione diretta fra recettori metabotropici e fattori di trascrizione e suggeriscono un ulteriore meccanismo tramite il quale la funzione di tali recettori può attivare risposte a lungo termine che coinvolgono modificazioni dell'espressione di specifici geni.

Farmacologia dei recettori GABA_B

Il prototipo di farmaco agonista che agisce sui recettori GABA_B è il baclofen, introdotto nella pratica clinica come agente spasmolitico negli anni 70, ben prima della scoperta degli stessi recettori GABA_B. Nella tabella 37.3 sono riassunti gli effetti farmacologici del baclofen. L'effetto miorilassante del baclofen è mediato da un'azione centrale e la sua particolare efficacia ne fa il farmaco di scelta per il trattamento della spasticità, compresa quella associata alla sclerosi multipla. Tuttavia, la comparsa di effetti collaterali spesso associati all'utilizzo di alti dosaggi può talora limitarne l'utilizzo. Recentemente comunque è stato messo a punto un sistema di somministrazione a livello dello spazio subaracnoideo spinale (terapia intratecale con baclofen), con un'efficacia clinica a dosi bassissime riducendo quindi anche possibili fenomeni di tolleranza. Il baclofen è anche in fase di sperimentazione in quanto efficace nella dipendenza da sostanze d'abuso quali cocaina, etanolo, nicotina e morfina-simili.

Oltre al baclofen, sono agonisti del recettore GABA_B l'acido 3-aminopropilfosfinico (3-APPA) e il suo analogo metilato che sono dotati di un'affinità per il recettore 10-100 volte maggiore. Due analoghi del baclofen, faclofen e saclofen, e la molecola SCH50911 possiedono invece un'azione antagonista sul recettore. Alcuni di questi antagonisti sono stati sperimentati quali agenti che potrebbero migliorare i processi cognitivi ed esercitare un effetto positivo sulle crisi epilettiche.

Più di recente, è stata proposta una nuova classe di composti che agiscono sul recettore GABA_B e sono dotati di un meccanismo d'azione differente, i modulatori

allosterici positivi. Tra questi, il composto CGP7930 e il GS39783. Queste molecole non esercitano alcuna azione diretta sul recettore, ma sono in grado di accentuare gli effetti del GABA o del baclofen legandosi su un sito diverso da quello dell'agonista che probabilmente è localizzato sulla subunità GABA_{B2} del complesso recettoriale (Figura 37.5). Questi modulatori positivi allosterici sono stati esaminati in modelli animali di dipendenza da cocaina ed entrambi si sono dimostrati efficaci nel ridurre la self-administration della sostanza senza la necessità di co-somministrare il baclofen. Questi risultati suggeriscono quindi che la modulazione allosterica del recettore GABA_B offre un efficace meccanismo che può ridurre gli effetti collaterali che possono associarsi all'utilizzo degli agonisti come il baclofen.

Va ricordato, in questo contesto, come i recettori GABA_B siano i mediatori di molte delle azioni farmacologiche indotte dall'acido γ -idrossibutirrico (GHB), una sostanza d'abuso con effetti deprimenti sulle funzioni cerebrali. L'affinità di questi recettori per il GHB non è elevata, ma comunque è compatibile con le concentrazioni della sostanza che vengono raggiunte in seguito alla sua somministrazione.

Riassunto schematico dei principali interventi farmacologici sulle sinapsi GABAergiche

Sintesi, captazione e catabolismo A eccezione del vigabatrin, farmaco antiepilettico che inibisce la GABA-transaminasi, non sono noti farmaci in grado di modificare queste funzioni che abbiano un'applicazione in clinica. Al contrario a livello sperimentale sono utili alcuni inibitori della GAD (isoniazide e acido ammino-ossiacetico) che riducono la sintesi del GABA e inducono le convulsioni.

Recettore GABA_A Gli agonisti recettoriali, come muscimolo, isoguvacina, THIP e acido imidazolacetico, capaci di attivare il recettore GABA_A sinaptico ed extrasinaptico, non hanno trovato applicazione terapeutica. Gli antagonisti recettoriali come la bicucullina hanno effetto convulsivante.

Sito di legame delle benzodiazepine A questo sito si legano farmaci con diversa struttura chimica che inducono effetti positivi (agonisti) o negativi (agonisti inversi). Tra gli agonisti vi sono le benzodiazepine (diazepam, flunitrazepam, clonazepam, clordiazepossido, alprazolam ecc.; i ciclopirroloni, zopiclone e suriclone, l'imidazopiridina zolpidem, la pirazolopirimidina zaleplon). Questi farmaci possiedono attività ansiolitica, anticonvulsivante, sedativa e ipnotica. Agonisti inversi come le β -carboline (DMCM, FG 7142) inducono un effetto convulsivante e ansiogeno. Gli effetti degli agonisti e degli agonisti inversi sono bloccati dall'antagonista flumazenil, che di per sé è privo di effetti farmacologici.

Sito di legame dei barbiturici I barbiturici inducono un effetto anticonvulsivante e ipnotico. Il sito di legame dei

TABELLA 37.3 Effetti farmacologici del baclofen mediati dal recettore GABA_B

Azioni in vivo	Effetti collaterali
▶ Diminuzione delle funzioni cognitive	▶ Sonnolenza
▶ Antinocicezione	▶ Vertigini
▶ Miorilassante	▶ Nausea
▶ Antipatico	▶ Ipotensione
▶ Soppressione del craving per sostanze d'abuso	▶ Convulsioni
▶ Aumento del consumo di cibo	▶ Allucinazioni
▶ Epilettogenesi	▶ Confusione mentale
▶ Rilassamento bronchiale	
▶ Soppressione del singhiozzo	
▶ Aggravamento degli episodi di assenza	
▶ Riduzione della peristalsi intestinale	
▶ Contrazione della muscolatura uterina	

barbiturici, localizzato a livello del canale allo ione Cl^- , è riconosciuto anche da farmaci convulsivanti come la picrosina e composti organofosforici (ad esempio, TBPS).

Sito di legame dei neurosteroidi I neurosteroidi allopregnanolone e allotetraidrodiossiccorticosterone sono in vitro e in vivo tra i più potenti ed efficaci modulatori positivi del recettore GABA_A . Hanno in vivo attività ansiolitica, anticonvulsivante e sedativa. Sono stati identificati due differenti siti di legame.

Anestetici generali ed etanolo Sebbene l'esistenza di siti specifici a livello del recettore GABA_A per questi composti sia stata solo ipotizzata, queste molecole potenziano la trasmissione GABA_A ergica. Tra gli anestetici generali si ricordano l'alotano, l'enflurano, il metossiflurano, l'isoflurano, il propofol e l'etomidato.

L'etanolo potenzia con elevata efficacia le azioni deprimenti sul SNC delle benzodiazepine e dei barbiturici.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'acido γ -aminobutirrico (GABA) è il principale neurotrasmettitore con funzione inibitoria presente nel sistema nervoso centrale dei mammiferi.
- ▶ I recettori per il GABA appartengono sia alla classe dei recettori-canale che a quella dei recettori accoppiati a G-proteine.
- ▶ Essi mediano la funzione inibitoria attraverso diverse vie di trasduzione intracellulare del segnale.
- ▶ I diversi tipi di recettori del GABA svolgono un ruolo fisiologico cruciale nella regolazione dell'eccitabilità neuronale in tutte le aree del SNC.
- ▶ Essi sono il bersaglio molecolare di numerose classi di farmaci di rilevanza clinica, quali benzodiazepine e anestetici generali, ormoni endogeni come i neurosteroidi, nonché di sostanze d'abuso quali l'etanolo.

Bibliografia essenziale

- ▶ Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW et al. Subtypes of gamma-aminobutyric acid receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 1998;50:291-313.
- ▶ Bettler B, Tiao JY. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABA_B receptors. *Pharmacol Ther* 2006;110:533-43.
- ▶ Biggio G, Sanna E, Serra M, Costa E (eds). *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. Vol. 48. New York: Raven Press, 1995.
- ▶ Biggio G, Purdy RH (eds). *Neurosteroids and Brain Function*. International Review of Neurobiology. Vol. 46. Waltham (Mass): Academic Press, 2001.
- ▶ Concas A, Mostallino MC, Porcu P et al. Role of brain allopregnanolone in the plasticity of 4-aminobutyric acid type A receptor in rat brain during pregnancy and after deliver. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:13284-9.
- ▶ Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG. Endogenous neurosteroids regulate GABA_A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 2006;444(7118):486-9.
- ▶ Olsen RW, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid_A receptors: Classification of the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev* 2008;60:243-60.
- ▶ Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G et al. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:971-88.
- ▶ Sanna E, Mostallino MC, Busonero F et al. Changes in GABA_A receptor gene expression associated with selective alterations in receptor function and pharmacology after ethanol withdrawal. *J Neurosci* 2003;23:11711-24.
- ▶ Smith SS (ed). *Neurosteroids effects in the central nervous system. The role of the GABA_A receptor*. New York: CRC Press, 2004.
- ▶ Ulrich D, Bettler B. GABA_B receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol* 2008;17:298-303.
- ▶ Wulff P, Goetz T, Leppä E et al. From synapse to behavior: rapid modulation of defined neuronal types with engineered GABA_A receptors. *Nat Neurosci* 2007;10:923-9.

La neurotrasmissione mediata da amminoacidi eccitatori

CAPITOLO

38

Flavio Moroni

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire conoscenze su sintesi, immagazzinamento, liberazione, inattivazione e metabolismo del glutammato nel sistema nervoso centrale, e sul ruolo di questo comune amminoacido nella neurotrasmissione eccitatoria e come precursore del GABA
- ▶ Acquisire informazioni su struttura e funzione delle proteine della sinapsi eccitatoria e dei differenti sottotipi di recettori e trasportatori come potenziali bersagli di farmaci
- ▶ Acquisire informazioni sull'importanza della trasmissione eccitatoria nei processi di plasticità sinaptica e in quelli dell'apprendimento e della memoria e sugli effetti devastanti dell'eccitotossicità
- ▶ Acquisire informazioni sui farmaci che modificano la trasmissione eccitatoria glutamatergica

Il glutammato è il neurotrasmettitore eccitatorio più diffuso nel SNC

Il glutammato è responsabile dell'eccitazione nella maggior parte delle sinapsi presenti nel sistema nervoso centrale: è ormai ben dimostrato che questo comune amminoacido è presente in concentrazione molto elevata (fino 100 mM) nelle vescicole sinaptiche, viene liberato dai terminali neuronali in maniera dipendente dalla presenza di Ca^{2+} e depolarizza strutture postsinaptiche attivando recettori specifici. Esistono inoltre, sulle membrane sia neuronali che gliali, specifici trasportatori capaci di trasportare all'interno delle cellule il glutammato una volta che sia stato liberato. Queste osservazioni hanno permesso di superare lo scetticismo della comunità scientifica che per molti anni aveva escluso la possibilità che un comune amminoacido bicarbossilico quale il glutammato, in genere molto studiato come precursore di un trasmettitore inibitorio (GABA) o per il suo ruolo nel metabolismo cerebrale dell'ammonio, nella sintesi delle proteine e di importanti co-fattori (acido folico, glutatone), fosse anche il mediatore dell'eccitazione sinaptica. Oggi si ritiene ben dimostrato che la neurotrasmissione eccitatoria glutamatergica sia responsabile di molte funzioni proprie del cervello (dalla percezione ordinata delle sensazioni e del dolore, all'apprendimento, alla memoria, al controllo del tono dell'umore e della funzione motoria). Alterazioni della funzione sinaptica eccitatoria sarebbero poi responsabili di patologie importanti di

tipo sia neurologico che psichiatrico quali: convulsioni, malattie neurodegenerative, morte neuronale post-ischemica, depressione, schizofrenia, dolore neuropatico ecc. Le conoscenze accumulate in questo settore dovrebbero pertanto facilitare la soluzione di importanti problemi ancora non risolti dalla medicina moderna. È doloroso constatare che i risultati clinici finora ottenuti non sono stati pari alle speranze generate dalle interessanti scoperte scientifiche e dagli enormi sforzi compiuti in ambito sia accademico che industriale degli ultimi decenni.

Sintesi e metabolismo del glutammato

La glutammina e il glucosio sono i precursori del glutammato

Il glutammato è il più abbondante amminoacido libero presente nel sistema nervoso centrale. Esso è distribuito in maniera piuttosto uniforme in tutte le regioni del cervello ed è presente sia nei neuroni che nella glia. Poiché la barriera ematoliquorale è quasi impermeabile al glutammato, questo deve essere sintetizzato nel tessuto nervoso. Il glucosio è da considerare il principale precursore del glutammato: dalla glicolisi e dal successivo ciclo di Krebs si forma alfa-chetoglutarato che può ricevere un gruppo amminico e formare glutammato. Diverse transaminasi sono in grado di catalizzare questa reazione (Figura 38.1). Un'altra importante via per la neosintesi di glutammato è

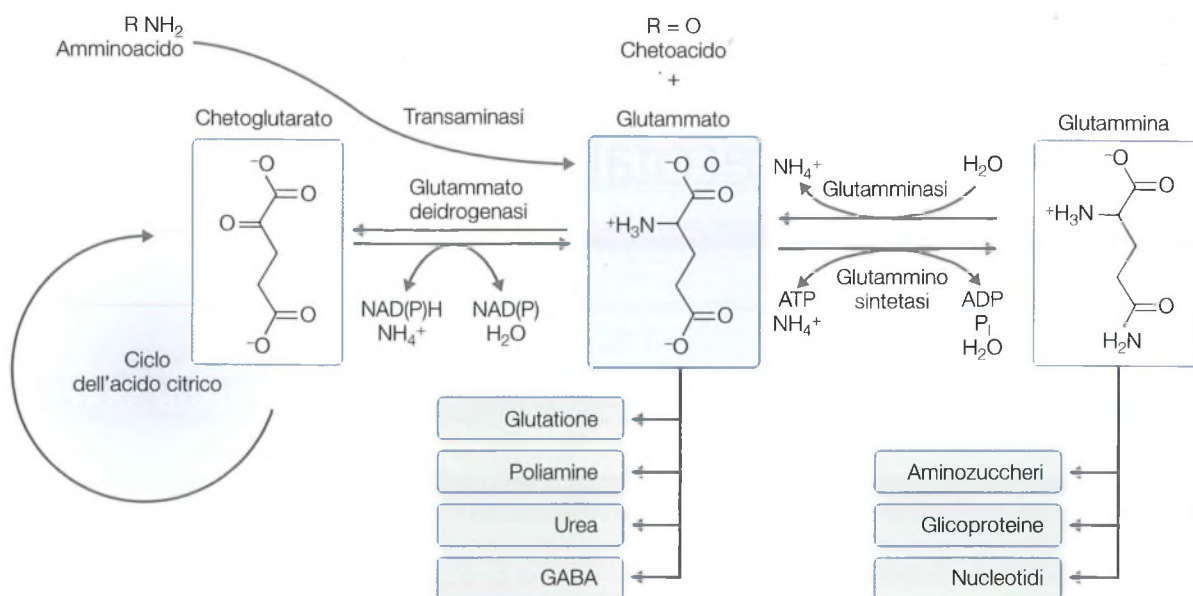


FIGURA 38.1 Sintesi e metabolismo del glutammato. I due enzimi chiave nella sintesi del glutammato sono: α -chetoglutarato-transaminasi e glutamminasi; per il metabolismo invece sono: glutammato deidrogenasi e glutammino sintetasi. Il glutammato si forma prevalentemente per transaminazione di un chetoacido prodotto dal ciclo degli acidi tricarbossilici, mentre la glutammina si forma per incorporazione di una molecola d'ammonio nel glutammato stesso. Sia il glutammato che la glutammina hanno un ruolo chiave in numerosi processi metabolici, alcuni dei quali sono elencati nella figura.

costituita dalla desamidazione della glutammina a opera della glutamminasi (Figura 38.1).

Il catabolismo dell'amminoacido è in gran parte da attribuire all'azione della glutammato deidrogenasi, enzima capace di formare α -chetoglutarato e ammonio. Una seconda via metabolica, particolarmente abbondante in cellule gliali, è facilitata dall'azione della glutammino sintetasi, che trasforma il glutammato in glutammina. Quest'ultima può essere eliminata (trasportata all'esterno della barriera emato-liquorale) o utilizzata dai neuroni per la sintesi del pool neurotrasmettitoriale di glutammato (Figure 38.1 e 38.2A).

Accumulo vescicolare del glutammato, trasporto e spegnimento del segnale

Trasportatori di membrana mantengono bassa la concentrazione extracellulare del glutammato

La concentrazione di glutammato nel tessuto nervoso è piuttosto elevata (fino a 10 mM), tuttavia, negli spazi extracellulari del cervello e nel liquido cefalorachidiano la concentrazione di glutammato è circa diecimila volte più bassa (<1 μ M). Ciò è in gran parte da attribuire alla presenza di efficienti trasportatori sulle membrane delle cellule sia neuronali che gliali. In condizioni fisiologiche, i trasportatori sono capaci di trasferire il glutammato dall'esterno all'interno della cellula (Figura 38.2) e contribuiscono allo spegnimento del segnale nelle sinapsi eccitatorie e a mantenere entro livelli fisiologici le concen-

trazioni dell'amminoacido nel liquido cefalorachidiano. Tecniche di biologia molecolare hanno permesso di identificare almeno 5 cDNA che codificano proteine capaci di trasportare glutammato. Nell'uomo questi trasportatori sono stati chiamati EAAT 1-5 (*Excitatory Amino Acid Transporters*). EAAT1, EAAT2, EAAT3 sono gli analoghi di trasportatori identificati precedentemente nel ratto e chiamati anche GLAST (*Glutamate and Aspartate Transporter*), GLT1 (*Glutamate Transporter 1*) ed EAAC (*Excitatory Amino Acid Carrier*), rispettivamente. EAAT-1 ed EAAT-2 sono prevalentemente espressi negli astrociti e negli oligodendrociti, EAAT-3 è espresso da gran parte dei neuroni del SNC, EAAT-4 è prevalentemente localizzato nelle cellule del Purkinje del cervelletto ed EAAT-5 nei fotorecettori e nelle cellule bipolari della retina. Il trasporto del glutammato dagli spazi extracellulari all'interno della cellula avviene utilizzando l'energia prodotta dalla $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATP-asi e quindi dal gradiente ionico ai due lati della membrana cellulare. Insieme all'amminoacido vengono co-trasportati all'interno della cellula tre ioni Na^+ e un protone H^+ , mentre uno ione K^+ viene trasferito all'esterno della cellula e l'equilibrio ionico (stechiometrico) viene di nuovo ottenuto grazie a una corrente anionica Cl^- -mediata. È stato suggerito che questa corrente anionica Cl^- -mediata possa attenuare l'eccitabilità neuronale e la liberazione addizionale di glutammato.

Modificazioni dell'espressione o della funzione dei trasportatori per il glutammato sono state associate a un elevato numero di situazioni patologiche, quali la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), diverse forme di epilessia, il danno cerebrale post-ischemico e post-traumatico, la corea di Huntington, la demenza da AIDS e altre forme

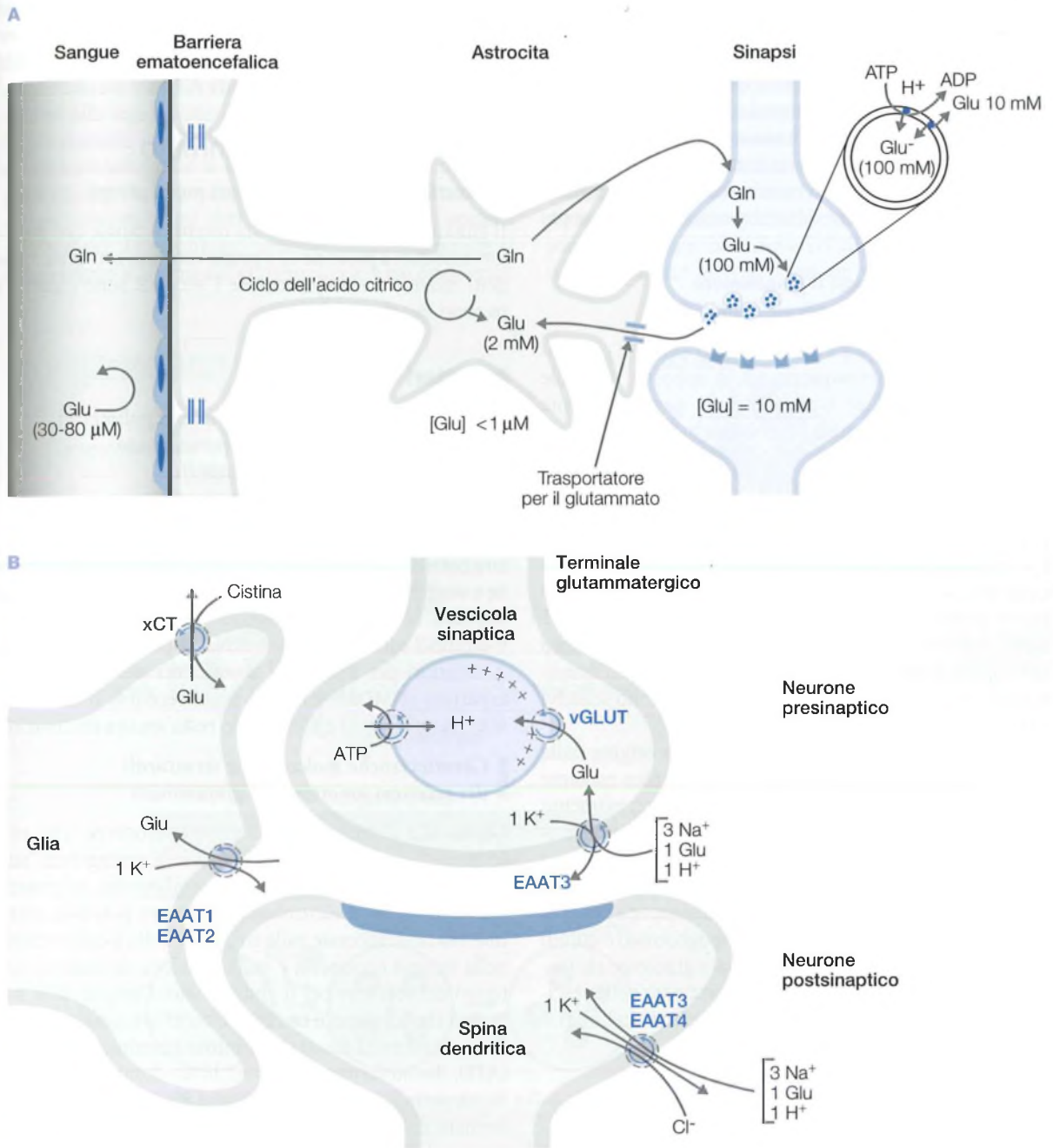


FIGURA 38.2 Compartimentalizzazione del glutammato cerebrale. **A.** Il glutammato neosintetizzato dalla glutammmina è accumulato nelle vescicole sinaptiche a opera di un trasportatore che sfrutta come fonte energetica il gradiente protonico fra il citoplasma e l'interno della vescicola. Parte del glutammato liberato durante l'attività sinaptica è ricaptato da cellule neuronali e parte da cellule gliali che sintetizzano glutammmina. Quest'ultima può essere riciclata nel pool trasmettitoriale di glutammato o essere trasportata fuori del sistema nervoso centrale attraverso la barriera ematoencefalica. Il processo permette fra l'altro di eliminare un eventuale eccesso di ammonio cerebrale. Le cellule gliali svolgono un ruolo chiave nel mantenere intorno a 1 μ M le concentrazioni di glutammato nel liquido cerebrospinale e negli spazi extracellulari del SNC. Solo in condizioni patologiche queste concentrazioni aumentano fino a divenire tossiche (eccitotossicità). **B.** Localizzazione e funzione dei trasportatori di membrana del glutammato e dello scambiatore cistina/glutammato. La glia partecipa allo spegnimento del segnale sinaptico anche perché esprime i trasportatori GLAST e GLT1 (EAAT1 ed EAAT2) oltre allo scambiatore glutammato/cistina. I neuroni esprimono prevalentemente EAAT3 (EAAC) e limitatamente alle cellule del Purkinje del cervelletto EAAT4. Lo scambiatore cistina/glutammato partecipa alla regolazione della trasmissione eccitatoria controllando la concentrazione dell'amminoacido negli spazi perisinpatici dove sono presenti recettori mGluR2/3 che modulano (inibiscono) la liberazione sinaptica del trasmettitore.

demenziali, la dipendenza da farmaci ecc. È ovvio quindi che tali trasportatori siano considerati un importante bersaglio per farmaci attivi nella patologia del SNC. È da segnalare che un comune antibiotico β -lattamico, il ceftriaxone, è capace di aumentare l'espressione di EAAT-2 (GLT1), il più attivo dei trasportatori gliali e di migliorare la prognosi della SLA in modelli animali.

Il ruolo dei trasportatori di membrana per il glutammato in fisiologia e patologia è descritto in maniera più ampia nel Capitolo 23.

Nei terminali nervosi il glutammato è concentrato nelle vescicole sinaptiche

Una volta trasportato all'interno della cellula, il glutammato può venire immagazzinato in apposite vescicole nelle quali raggiunge concentrazioni particolarmente elevate (fino a 100 mM). Ciò è dovuto all'attività di ulteriori specifici trasportatori: i vGLUT (*Vesicular Glutamate Transporter*), strutture proteiche appartenenti alla famiglia dei cosiddetti carrier per soluti (SLC) trattati nel Capitolo 23. Sono note tre isoforme di vGLUT, vGLUT1 e vGLUT2; sono espressi esclusivamente nelle terminazioni presinaptiche, mentre vGLUT3 è ubiquitario ed è presente soprattutto nei neuroni GABAergici. I vGLUT hanno una bassa affinità per il glutammato e la loro attività inizia solo quando le concentrazioni dell'amminoacido superano 1 mM. Sono comunque molto selettivi e non sono capaci di trasportare l'aspartato.

L'energia usata dai trasportatori vescicolari origina dalla pompa protonica e dal gradiente elettrochimico esistente ai due lati della vescicola sinaptica. L'immagazzinamento del glutammato differisce quindi da quello dell'acetilcolina e delle catecolamine che sono ancorate in maniera semistabile ai componenti vescicolari. Ciò potrebbe dar ragione del perché, quando la vescicola sinaptica perde la propria capacità metabolica (ipossia, ipoglicemia) e quindi la possibilità di mantenere un adeguato gradiente elettrochimico, anche il glutammato immagazzinato nelle vescicole diffonde fino a raggiungere gli spazi extracellulari.

Anche lo scambiatore glutammato-cistina controlla la concentrazione di glutammato

Le concentrazioni di glutammato negli spazi extracellulari del SNC sono regolate non solo dai trasportatori EAAT1-5, che in condizioni fisiologiche trasferiscono il trasmettitore dall'esterno all'interno della cellula, contribuendo così allo spegnimento del segnale sinaptico, ma anche dallo scambiatore cistina-glutammato. Quest'ultimo trasporta cistina all'interno della cellula scambiandola con glutammato che al contrario viene trasferito negli spazi extracellulari.

Lo scambiatore è espresso dalle cellule gliali e da molti altri tipi cellulari (anche al di fuori del SNC) e ha un ruolo chiave nel fornire una sufficiente quantità di cistina/cisteina per la sintesi di glutazione, un tripeptide che gioca un ruolo chiave nella difesa contro lo stress ossidativo. È stato dimostrato che l'espressione di questo co-trasportatore è molto ridotta nella dipendenza da cocaina. Questo modifica la concentrazione perisinpatica

di glutammato che può così interagire con i recettori metabotropi del secondo gruppo e portare a significative modificazioni della fisiologica funzione eccitatoria e della plasticità sinaptica.

Recettori per il glutammato

Recettori ionotropi e recettori metabotropi

Il glutammato può attivare sia recettori-canale che recettori associati a proteine G. I primi vengono comunemente detti *recettori ionotropi*, mentre i secondi sono chiamati *recettori metabotropi*.

Recettori ionotropi

I recettori ionotropi sono complessi polimerici costituiti da 4 subunità che partecipano a formare un canale ionico aperto dall'interazione con il glutammato

I recettori ionotropi hanno differenti conduttanze ioniche, cinetiche di attivazione/inattivazione o di desensitizzazione e vengono classificati in tre categorie in base all'agonista selettivo. Si distinguono pertanto: 1. recettori per l'acido 6-amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazol-propionico (AMPA); 2. recettori per il kainato; 3. recettori per l'N-metil-D-aspartato (NMDA). Esistono poi i recettori δ che sono stati meno studiati e il cui ruolo resta ancora da chiarire.

Caratteristiche molecolari e strutturali dei recettori ionotropi del glutammato

Grazie allo sviluppo di metodologie moderne, che utilizzano chimere proteiche, tecniche di mutagenesi "site directed", immunocitochimica, cristallografia, microscopia elettronica ed elettrofisiologia, è ora possibile avere informazioni accurate sulla struttura, sulla localizzazione nella sinapsi eccitatoria e sulla funzione di ciascun sottotipo dei recettori per il glutammato. Ognuna delle subunità che formano il complesso recettore canale (Figura 38.3) è costituita da: a) un dominio amminico terminale (ATD, *Amino Terminal Domain*); b) un dominio capace di riconoscere il legante (LBD, *Ligand Binding Domain*) che è formato da due segmenti (S1 ed S2); c) un dominio che attraversa la membrana (TMD, *Trans Membrane Domain*) formato da quattro segmenti lipofili, tre dei quali capaci di attraversare completamente la membrana plasmatica (M1, M3, M4) e uno capace di inserirsi ad ansa nella membrana stessa (M2). In una precisa zona di questo sito, che costituirebbe una delle pareti del canale, può essere presente o una glutammina (Q) o un'arginina (R). A seconda di quale sia l'amminoacido ivi espresso, i canali vengono ad avere distinte caratteristiche elettrofisiologiche. I recettori che nel sito Q/R hanno un residuo R sono caratterizzati da scarsa permeabilità allo ione calcio e la loro curva di relazione corrente-voltaggio è lineare. Quando è presente Q, al contrario, il canale è permeabile allo ione calcio. Ciascuna subunità, infine, ha una porzione carbossilica terminale (CTD, *Carboxy Terminal Domain*) contenente siti di fosforilazione e varie sequenze capaci di interagire

con le altre proteine della densità postsinaptica. Questo dominio (Figura 38.3A, ma non riportato nella figura in 38.3B) contiene siti di fosforilazione, che possono essere catalizzati sia da PKA che PKC e da CaMKII che partecipano alla regolazione del traffico delle subunità e alla loro eventuale inserzione o rimozione dalla membrana sinaptica modulando le interazioni con le altre proteine presenti nei domini postsinaptici (PDZ). Similmente a quanto avviene negli altri recettori ionotropici, anche i recettori per il glutammato cambiano conformazione e si aprono dopo il legame del glutammato ai 4 siti ortosterici.

Ma subito dopo l'apertura il recettore entra in uno stato desensitizzato che prevede la richiusura del canale (Figura 38.3C). Lo stato di fosforilazione delle subunità recettoriali è importante per la regolazione della probabilità e dei parametri cinetici di apertura e chiusura del canale. La Figura 38.3A riporta in forma schematica la struttura di una delle 4 subunità che costituiscono il complesso recettoriale e la 38.3B riporta come si assembla il complesso multiproteico: gli ATD e gli LBD delle 4 subunità sono organizzati come dimeri di dimeri (hanno pertanto una doppia simmetria). Ciascun dimero forma poi la

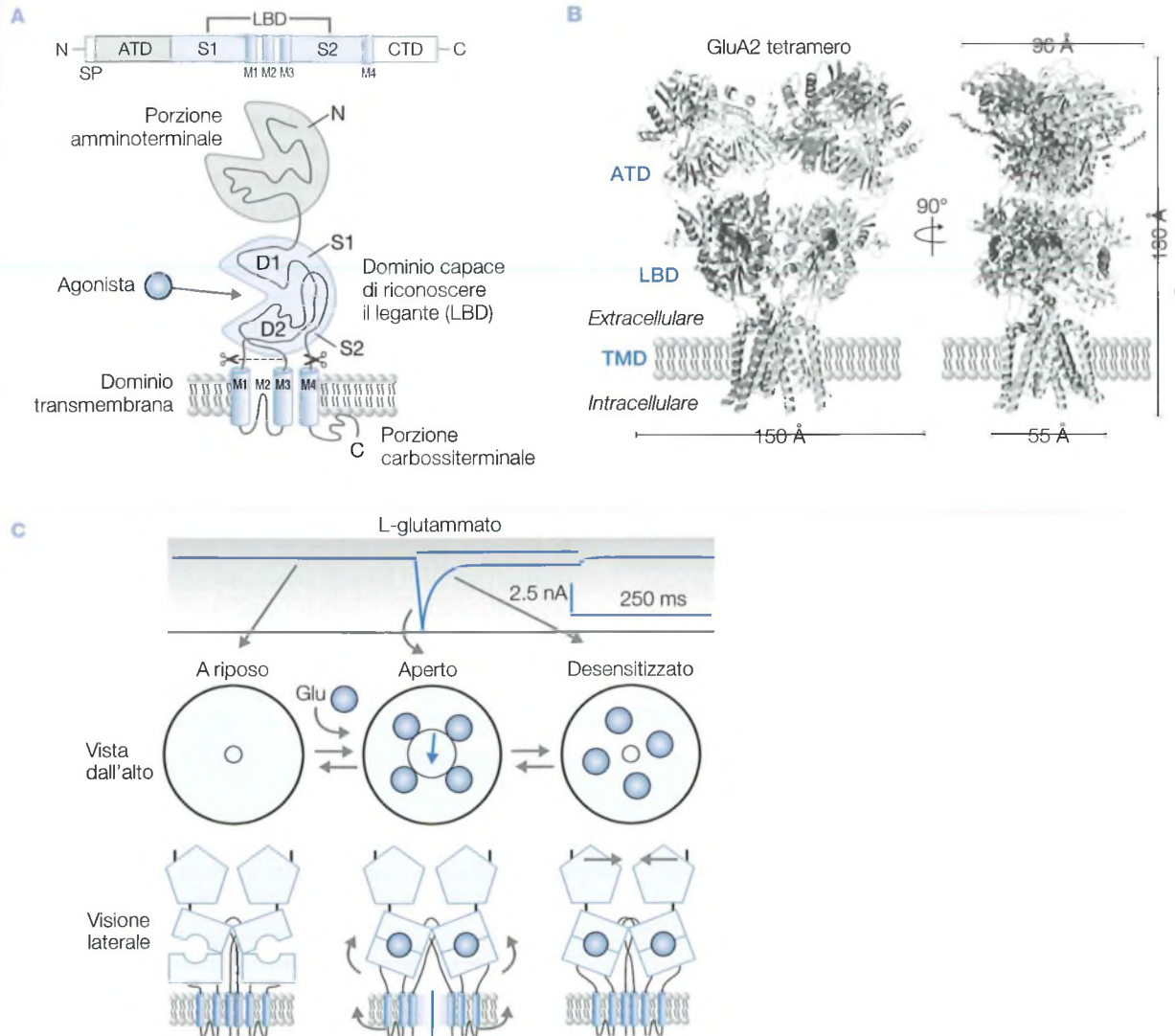


FIGURA 38.3 Struttura, organizzazione e funzione molecolare dei recettori ionotropici per il glutammato. **A.** Rappresentazione schematica della struttura di ogni subunità dei recettori ionotropici: la porzione amminoterminale è extracellulare (ATD) ed è seguita dall'emi-dominio S1 e da tre porzioni idrofobe (M1; M2, M3) due delle quali attraversano completamente la membrana, mentre la seconda forma un'ansa nella membrana. La proteina è poi costituita dall'emi-dominio S2, da un'ultima porzione idrofoba (M4) che attraversa completamente la membrana e che fa parte del dominio TMD (*TransMembrane Domain*) e da una porzione C-terminale citoplasmatica contenente varie zone capaci di legare le proteine della densità postsinaptica. Gli emi-domini S1 ed S2 hanno una struttura analoga a quella delle proteine batteriche periplasmatiche capaci di legare glutammato. All'interno di questi emi-domini si trovano il sito di riconoscimento per il glutammato e le altre molecole agoniste (LBD, *Ligand Binding Domain*). **B.** Struttura molecolare in forma tridimensionale del complesso recettore-canale. Il complesso tetramerico è formato dall'assemblaggio di due dimeri e in ciascun dimero è visibile il sito di riconoscimento del glutammato. **C.** Viene illustrato come, in seguito all'applicazione di glutammato, il canale ionico possa aprirsi e poi eventualmente desensitizzarsi (vedi registrazione elettrofisiologica in alto nella figura). Questo fenomeno è schematizzato sia nella visione dall'alto che in quella laterale del complesso recettore-canale.

metà del poro che viene delimitato dai TMD delle 4 subunità. Gli ATD di tutte le subunità sembrano avere un ruolo importante nell'assemblaggio del recettore maturo e nel suo successivo inserimento nella zona sinaptica della membrana neuronale. L'assemblaggio del recettore avviene infatti nel reticolo endoplasmatico del neurone, dove viene anche controllato il folding della proteina. I processi che regolano l'inserimento del recettore nella membrana sinaptica hanno un ruolo importante nella regolazione della plasticità neuronale, un evento estremamente importante nei processi di apprendimento e memoria (vedi CD: Approfondimento 38.1. *Plasticità sinaptica: il potenziamento e l'inibizione sinaptica di lunga durata (LTP e LTD)*).

Si ritiene che tutte le subunità che partecipano alla formazione dei diversi recettori ionotropi per il glutammato originino da un unico gene primordiale la cui evoluzione filogenetica è riportata nella figura 38.4.

■ Recettori AMPA

I recettori AMPA sono localizzati nella membrana postsinaptica e sono responsabili della risposta eccitatoria (depolarizzante) rapida tipica delle sinapsi glutammatergiche. Sono oligomeri composti dalle subunità GluA1-GluA4. Le loro cinetiche di attivazione/inattivazione e desensitizzazione sono molto veloci (dell'ordine dei millisecondi). In linea di massima i recettori attivati dall'AMPA sono molto permeabili al Na^+ e poco al Ca^{2+} . La subunità GluA2 è la più diffusa; essa contiene una arginina (R) nel sito Q/R dell'ansa del secondo dominio transmembranario e ciò rende il recettore AMPA praticamente impermeabile agli ioni calcio. Quindi

nella stragrande maggioranza dei casi i recettori AMPA del SNC sono poco permeabili al calcio e sono fatti da combinazioni di subunità in cui almeno una è di tipo GluA2. Le uniche cellule che non esprimono GluA2 sono le cellule della glia di Bergmann del cervelletto che, infatti, rispondono con un forte influsso di calcio alla stimolazione glutammatergica.

Un'ultima "curiosità" importante a proposito di GluA2 è il fatto che il suo gene contiene il codone per la glutammina (Q) a livello del sito Q/R; il fatto che l'mRNA invece codifichi per l'arginina (R) è dovuto a un processo di "editing" dell'mRNA. Le proprietà elettrofisiologiche delle cellule che esprimono recettori AMPA sono governate quindi non solo da meccanismi di controllo dell'espressione genica delle diverse subunità, ma anche dal patrimonio di enzimi che processano l'mRNA e dai segnali "trofici" che ne regolano l'attività.

Il kainato è in grado di interagire con questi recettori provocando una depolarizzazione prolungata, parziale ma non desensibilizzante, che porta ad alterazioni importanti dell'omeostasi cellulare e che giustifica il termine di neurotossina dato a questa molecola.

■ Recettori per il kainato

Recettori funzionali per il kainato possono essere espressi in oociti iniettando mRNA che codifica per GluK1-GluK5 (Figura 38.4). I messaggeri per queste subunità sono diffusamente espressi nel SNC indicando che i recettori per il kainato possono essere importanti nel funzionamento di molte reti neurali. Come sopra accennato, le risposte elettrofisiologiche del kainato mediate da recettori specifici sono in genere mascherate dagli effetti depolarizzanti che il kainato esplica anche nei confronti dei recettori AMPA. Una parte dei recettori al kainato è presente sulla membrana presinaptica ed è in grado di modulare la liberazione di trasmettitore e quindi anche l'efficienza delle connessioni sinaptiche.

Negli oociti si possono ottenere correnti attivate da kainato semplicemente iniettando mRNA per GluK1-GluK3; nessuna corrente si genera invece quando viene iniettato solo GluK4 o GluK5. Tuttavia le proprietà elettrofisiologiche di GluK1-GluK3 si modificano drasticamente e diventano simili a quelle riscontrabili nei neuroni, ove esse siano co-esprese con GluK4 o GluK5 suggerendo che i recettori per il kainato presenti nel SNC sono formati da una combinazione di subunità diverse. Da notare che sia GluK1 che GluK2 possono esistere sia nella forma R che nella forma Q nel sito Q/R e che GluK2 presenta altri due siti di "editing" dell'mRNA a livello del dominio M1: quindi da un singolo gene per GluK2 possono essere prodotti 8 mRNA diversi che codificano per proteine con proprietà elettrofisiologiche e permeabilità al calcio diverse. Ancora una volta lo studio di questi recettori dimostra come le proprietà elettrofisiologiche e farmacologiche di un neurone dipendano non solo da quale gene viene espresso, ma anche dal patrimonio di sistemi di editing dell'mRNA a disposizione della cellula e dagli eventi che li regolano.

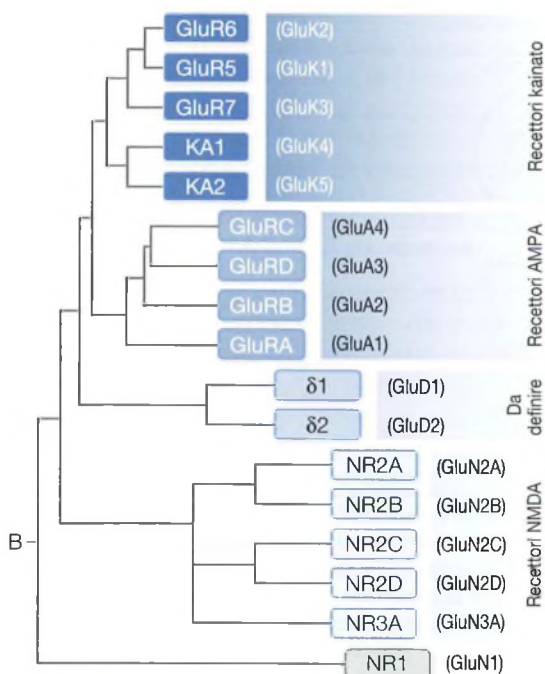


FIGURA 38.4 Dendrogramma delle subunità dei recettori ionotropi. La denominazione delle subunità è quella proposta dalla IUPHAR. (Da: Pharmacol Rev 2010;62:405)

■ Recettori per l'NMDA

L'NMDA attiva un particolare tipo di recettori-canale dotati di cinetiche elettrofisiologiche piuttosto lente (dell'ordine delle centinaia di millisecondi) e di elevata permeabilità agli ioni Ca^{2+} . Il complesso recettoriale è formato dalla subunità GluN1 e da almeno una delle subunità GluN2A-GluN2D e in molti casi anche da GluN3A o GluN3B. Per attivare questo recettore è necessaria la presenza sia di glutammato, che interagisce con le subunità GluN2, che della glicina o della D-serina, che interagiscono invece con i dimeri formati dalle subunità GluN1 e GluN3. In condizioni di base (potenziale di membrana a livelli fisiologici), lo ione Mg^{2+} previene l'attivazione del canale e non permette l'ingresso di Ca^{2+} anche in presenza dei trasmettitori. Solo quando la cellula è depolarizzata (ad esempio in quanto il recettore AMPA è attivato), il blocco che lo ione Mg^{2+} esercita a livello del canale ionico viene rimosso e il recettore NMDA diviene permeabile (attivato). Tutte le subunità che costituiscono il complesso recettoriale contengono un residuo di asparagina (N) nel sito Q/R del territorio M2: questo aminoacido è fondamentale nel determinare sia l'alta permeabilità al Ca^{2+} che il blocco da Mg^{2+} .

Il canale è inoltre finemente modulato dalla presenza di alcune poliamine, dalla concentrazione extracellulare di protoni, dallo stato di ossido-riduzione dei gruppi -SH presenti nelle proteine del complesso recettoriale e dall'attivazione o meno dei recettori metabotropi per il glutammato (vedi oltre). L'influsso di Ca^{2+} mediato dall'attivazione del recettore per l'NMDA è significativo, può mediare importanti effetti biologici e addirittura portare la cellula a morte (vedi paragrafo Glutammato ed eccitotossicità). Durante lo sviluppo del SNC, l'attivazione del recettore per l'NMDA può avere azioni trofiche e regolare la formazione delle reti neurali e l'efficienza della trasmissione sinaptica. Forse per questo esso è finemente

regolato attraverso diversi meccanismi (blocco da Mg^{2+} ; stimolazione da due trasmettitori; regolazione dallo stato di ossido-riduzione cellulare, dalla concentrazione locale di protoni e di poliamine).

Si è accennato che affinché il glutammato possa attivare questo recettore occorre che il sito di legame per la glicina sia occupato. Ciò ha delle ovvie implicazioni terapeutiche in quanto permette di modulare la risposta di questo recettore anche in condizioni di eccesso di glutammato. Antagonisti del sito per la glicina presente sui recettori per l'NMDA sono stati proposti per ridurre il danno ischemico nell'ictus. Purtroppo i risultati clinici sono stati deludenti.

Recettori metabotropi

Tre sottogruppi di recettori metabotropi per il glutammato

I recettori metabotropi per il glutammato (mGluR) sono recettori associati a proteine G e selettivamente stimolati dall'acido 1-amino-ciclopentan-1,3-dicarbossilico (1S,3R-ACPD). Sono stati identificati 8 cDNA (da mGluR1 a mGluR8, ciascuno con possibili varianti) che li codificano e, sulla base della loro struttura, della loro associazione agli effettori e della loro farmacologia, vengono classificati in tre sottogruppi (Tabella 38.1).

Il primo sottogruppo è costituito da mGluR1 e mGluR5; è prevalentemente accoppiato a proteine Gq/G₁₁ e all'attivazione del ciclo degli inositoli. Altri processi di trasduzione del segnale coinvolgono l'attivazione dell'adenilciclastasi, della fosfolipasi-D, o la stimolazione della cascata delle MAP/ERK-chinasi e di mTOR/p70 S6 chinasi. Il DHPG è un agonista relativamente selettivo per questi recettori.

TABELLA 38.1 Possibili usi terapeutici dei recettori metabotropi per il glutammato (mGlu): agonisti, antagonisti e modulatori (PAM e NAM)

	Gruppo I		Gruppo II		Gruppo III			
	mGlu1	mGlu5	mGlu2	mGlu3	mGlu4	mGlu6	mGlu7	mGlu8
Trasduzione	Fosfolipasi C (G _q); Adenilciclastasi (G _s); Fosfolipasi D; Jun chinasi; mTor/p70 chinasi		Adenilciclastasi (G _{i/o}) PI3 chinasi		Adenilciclastasi (G _{i/o}) PI3 chinasi; MAP-chinasi			
Agonisti	DHPG	DHPG CHPG	DCGIV	DCGIV	L-AP4	L-AP4	L-AP4	L-AP4
Antagonisti competitivi	AIDA LY367385 3-Matida		LY341495	LY341495				
NAM	CPCCOEt	MTEP Fenobam					MMPIP	
PAM	Ro67-4853	CPPHA ADX47273	LY487379		PHCC		AMN82	
Attività terapeutica? (Antagonisti e NAM)	Neuro-protezione Dolore	Dipendenze Obesità Sindrome dell'X-fragile					Epilessia	
Attività terapeutica? (Agonisti e PAM)	Nootropi Atassia	Schizofrenia	Schizofrenia Ansia Epilessia Dolore	Neuro-protezione	Morbo di Parkinson Neuro-blastoma	Retinite pigmentosa	Ansiolitici Morbo di Parkinson	Dipendenze

- Il secondo sottogruppo è composto da mGluR2 ed mGluR3; è accoppiato a proteine Gi e alla inibizione dell'adenilato ciclasi. Agonista selettivo di questi recettori è il DCG-IV.
- Il terzo sottogruppo è costituito da mGluR4, mGluR6, mGluR7 ed mGluR8. Anch'esso è associato a proteine Gi e alla inibizione dell'adenilato ciclasi. L-AP4 è un agonista selettivo per questi recettori.

Insieme al recettore GABA_B, ai recettori per i ferormoni, ai recettori vomero-nasali e per il gusto e al sensore per il Ca²⁺ (CaSR) espresso dalle cellule coinvolte nei meccanismi preposti al mantenimento dei livelli plasmatici di questo ione (paratiroide, rene, osso), gli mGluRs costituiscono una particolare famiglia (famiglia C) di recettori associati a proteine G. La loro struttura molecolare è schematizzata nella figura 38.5 ed è costituita da: a) un lungo dominio N-terminale formato da due porzioni globulari (LB1 ed LB2) che racchiudono il sito di riconoscimento del glutammato; b) un dominio ricco di cisteine; c) sette domini idrofobi che attraversano la membrana (M1-M7) e che sono connessi da tre anse citoplasmatiche e, infine, d) un dominio carbossilico terminale contenente siti di fosforilazione.

I vari mGluR sono distribuiti in modo differenziale nel SNC e più sottotipi possono coesistere nella stessa popolazione neuronale. Gli effetti finali della loro attivazione possono essere sia eccitatori che inibitori. Nel cervelletto, ad esempio, la stimolazione di mGluR1 porta a una attivazione di canali al potassio dipendenti da Ca²⁺ (la produzione di IP₃ provoca un aumento della concentra-

zione intracellulare di Ca²⁺, vedi Capitolo 10) e quindi a iperpolarizzazione; a livello ippocampale, invece, l'attivazione degli stessi recettori aumenta l'eccitabilità neuronale attraverso inibizione dei canali al potassio operati dal voltaggio. Esistono poi mGluR localizzati a livello presinaptico capaci di regolare la liberazione del trasmettitore con meccanismi particolarmente interessanti. Così la stimolazione di mGluR2, mGluR4 o mGluR7 può ridurre l'ingresso di Ca²⁺ nei terminali nervosi inibendo direttamente i canali voltaggio dipendenti e riducendo così la liberazione sinaptica di trasmettitore. La regolazione del funzionamento dei circuiti neuronali ippocampali operato dai mGluRs è particolarmente interessante: la stimolazione dei recettori mGluR4 ed mGluR7 riduce la liberazione di glutammato, mentre la stimolazione di mGluR5 può aumentare l'eccitabilità del circuito forse anche perché amplifica le risposte di tipo ionotropo. Stimoli di bassa intensità vengono pertanto bloccati, mentre stimoli potenti, in grado di superare l'inibizione presinaptica, vengono amplificati. In questo modo, la strategica localizzazione dei differenti mGluR porta alla formazione di sistemi filtranti capaci di aumentare il rapporto segnale/rumore degli stimoli che convergono su questo circuito. In una tipica sinapsi eccitatoria coesistono recettori ionotropi e metabotropi a livello sia pre- che post- sinaptico. Studi basati sulla microscopia elettronica e sulle moderne metodologie per l'identificazione e la caratterizzazione delle proteine (proteomica) hanno permesso di accumulare informazioni importanti sui meccanismi molecolari della regolazione del numero di complessi recettoriali disponibili per la funzione eccitatoria e, di conseguenza, per la comprensione dei processi di plasticità sinaptica. Particolare importanza è stata attribuita alle proteine "homer" che sono capaci di formare una specie di reticolo che permette l'interazione dei recettori ionotropi, di quelli metabotropi e di enzimi funzionalmente importanti ai fini della modulazione della risposta sinaptica, quali la Ca-modulina II (CaMKII) e molte altre chinasi (vedi Capitolo 32).

La farmacologia dei mGluR ha avuto un enorme impulso negli ultimi anni con la scoperta della possibilità di amplificare o di inibire la funzione dei recettori agendo non solo sul sito di riconoscimento del glutammato, ma anche su un sito allosterico localizzato nella porzione recettoriale contenente i 7 domini che attraversano la membrana plasmatica. Questo sito, più facilmente aggredibile con le metodologie della moderna chimica farmaceutica, ha permesso di ottenere molecole dotate di elevata potenza, specificità e capacità di attraversare le membrane e raggiungere il SNC (Figura 38.6).

Sono oggi disponibili eccellenti modulatori allosterici sia positivi (PAM) che negativi (NAM) per ciascuno dei differenti recettori mGlu e l'osservazione che la loro stimolazione o inibizione può tradursi in un aumento o in una diminuzione della conduttanza mediata dai recettori ionotropi fa dei recettori mGlu un bersaglio ideale per la modulazione dell'eccitazione sinaptica. È quindi facile immaginare l'interesse scientifico e industriale sia dei

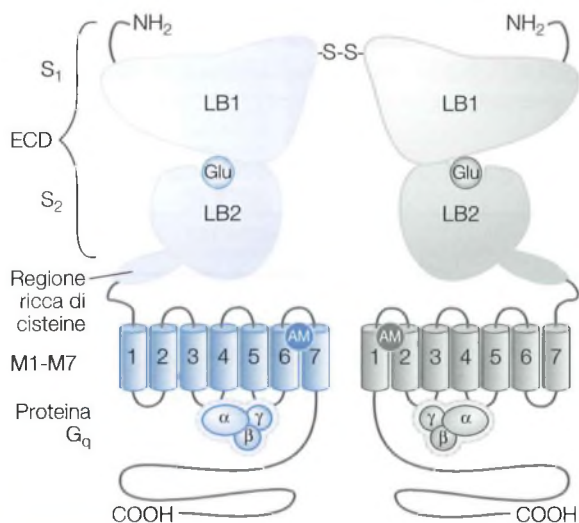
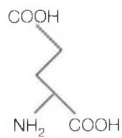
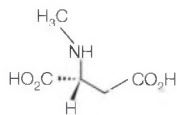


FIGURA 38.5 Struttura dei recettori metabotropi per il glutammato. I mGluRs hanno un largo dominio N terminale extracellulare (ECD) che avrebbe una struttura analoga a quella delle proteine batteriche periplasmatiche. Nel largo dominio amminico extracellulare sono localizzate due zone globulari che delimitano il sito di legame con il glutammato (LB1 ed LB2). È poi presente una regione ricca di cisteine che connette la parte extracellulare con i sette domini transmembrana della proteina. Nelle anse intracellulari sono presenti siti di interazione con le differenti proteine G e nella regione TM6 e TM7 è presente un sito capace di riconoscere i modulatori allosterici.

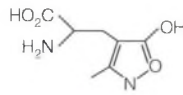
Agonisti dei recettori ionotropi



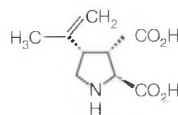
Glutammato



NMDA

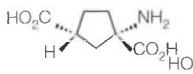


AMPA

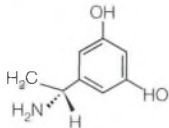


Kainato

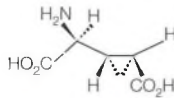
Agonisti dei recettori metabotropi



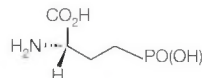
1S, 3R-ACPD



DHPG

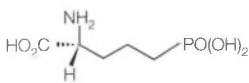


L-CGG-I

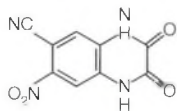


L-AP4

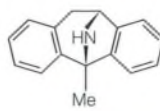
Antagonisti dei recettori ionotropi



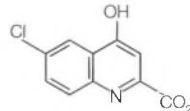
AP5



CNQX

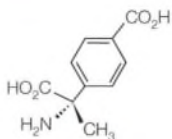


MK-801

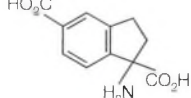


7-Cl-Chinurenato

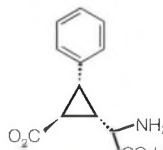
Antagonisti dei recettori metabotropi



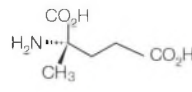
MCPG



AIDA



PCCG IV



EGLU

FIGURA 38.6 Prototipi di alcune delle molecole agoniste e antagoniste dei recettori ionotropi e metabotropi per il glutammato che sono state utilizzate per ricerche sperimentali. NMDA, AMPA e kainato stimolano i recettori ionotropi cui hanno dato il nome. 1S,3R-ACPD è un agonista non specifico dei recettori metabotropi; DHPG è un agonista del I gruppo dei mGluR; L-CGG1 stimola i recettori mGlu del II gruppo; L-AP4 stimola i recettori mGlu del III gruppo; AP5 è un antagonista competitivo dei recettori NMDA; CNQX antagonista dei recettori AMPA; MK-801 antagonista non competitivo dei recettori NMDA; 7Cl-Chinurenato antagonista del sito della glicina presente sui recettori NMDA; MCPG antagonista non specifico dei recettori mGlu; AIDA antagonista mGluR1; PCCGIV antagonista mGluR2/3; EGLU antagonista mGluR del III gruppo.

PAM che dei NAM per i recettori mGlu che sono ora proposti come possibili agenti terapeutici nella patologia dell'apprendimento, in quella degenerativa dei gangli della base (Parkinson, corea), nella genesi degli attacchi epilettici, nel controllo del dolore, nel controllo dell'ansia e del tono dell'umore, nella patologia schizofrenica e nei processi di degenerazione post-ischemica (Tabella 38.1).

Ruolo del sistema glutammatergico in fisiologia e patologia: effetto di farmaci e tossici

■ Glutammato ed eccitotossicità

Un aumento delle concentrazioni di glutammato negli spazi extracellulari del cervello è selettivamente tossica per i neuroni. Può causare, infatti, un particolare tipo di lesione detta comunemente "eccitotossica" che potrebbe avere importanza patogenetica nel danno cerebrale che consegue a ictus, trauma, arresto cardiaco, convulsioni. La componente eccitotossica del danno cerebrale sembra contribuire anche al decorso di alcune malattie degenerative quali la demenza di Alzheimer, la corea di Huntington, il morbo di Parkinson, la demenza da HIV o da altre meningoencefaliti virali.

La morte neuronale da eccessivo accumulo di glutammato negli spazi extracellulari sembra poter avere sia le

caratteristiche della necrosi che quelle dell'apoptosi, a seconda dell'area cerebrale coinvolta e della situazione metabolica dei neuroni interessati. Un ruolo chiave nella perdita eccitotossica di neuroni è certamente svolto da un eccessivo accumulo citoplasmatico di calcio con conseguente attivazione di numerosi enzimi quali: peptidasi (caspasi, catepsine), lipasi, endonucleasi, nitrossido-sintetasi, xantino ossidasi. L'aumentata attività di alcuni di questi enzimi può portare fra l'altro alla formazione di radicali liberi altamente reattivi che danneggiano il DNA e che attivano enzimi nucleari quali la poli(ADP-ribosio) sintetasi, che depleta la cellula di ATP e contribuisce ad attivare processi sia necrotici che apoptotici.

L'eccessiva stimolazione dei recettori per gli aminoacidi eccitatori può avvenire per eccesso di liberazione e/o per ridotto trasporto da parte dei trasportatori. È anche possibile che molecole attive sui recettori per gli aminoacidi eccitatori vengano ingerite con i cibi o si formino durante il metabolismo intermedio. Nel 1987, nell'isola Prince Edwards, in Canada, un numero significativo di abitanti presentò dolori addominali e diarrea cui seguirono amnesie e demenza. Nei casi che giunsero all'autopsia fu riscontrata degenerazione delle cellule piramidali dell'ippocampo e gliosi cerebrale diffusa. È ormai accertato che tale patologia fu causata dall'acido domoico, un agonista dei recettori al kainato, presente quell'anno in concentrazione eccessiva nelle cozze di cui gli abitanti dell'isola facevano largo uso.

Altre malattie neurologiche gravi possono essere causate da eccessiva ingestione di cibi contenenti amminoacidi eccitatori quali la 2-metil-amino-anilina (BMAA). È questo un componente della farina preparata dai semi di una palma (*Cica circinalis*) di cui si nutrono gli abitanti dell'isola di Guam (Arcipelago di Comorro). Tali popolazioni hanno un'elevata incidenza di malattie degenerative quali la sclerosi laterale amiotrofica, il Parkinson e la demenza. La continua ingestione di elevate quantità di BMAA sembra poter contribuire all'elevata incidenza di tali patologie.

Anche il neuroparalisi, caratterizzato da paraplegia spastica, una malattia neurologica comune nell'Africa orientale e nell'Asia del Sud sembra dovuto alla eccessiva ingestione di un amminoacido (β -oxalilamino-alanina, BOAA) presente nel *Latirus sativus* (cicerchia).

■ Glutammato e depressione

Negli ultimi anni l'interesse scientifico e industriale per le molecole attive sui recettori del glutammato è stato risvegliato dall'osservazione che la ketamina, un anestetico generale capace di antagonizzare i recettori NMDA, ove somministrata a basse dosi a pazienti con depressione resistente ai trattamenti disponibili (SSRI, SNRI), riduce rapidamente la sintomatologia depressiva. In realtà, a ben pensarci, questa informazione sembra piuttosto logica: tutti sanno che dosi generose di alcol attenuano la "malinconia" (molti alcolisti sono anche dei depressi). Ed è anche noto da almeno venti anni che l'alcol (a concentrazioni relativamente alte) inibisce i recettori NMDA. Pertanto dovrebbe essere ragionevole ipotizzare che l'inibizione dei recettori NMDA possa ridurre la sintomatologia della depressione.

Lentità dell'effetto della ketamina ha in qualche modo entusiasmato i clinici che hanno testato il farmaco (i sintomi della depressione sono di fatto eliminati poche ore dopo la somministrazione di basse dosi del farmaco e l'azione terapeutica dura 3-4 giorni). È noto che gli antidepressivi classici hanno bisogno in media di un trattamento prolungato (da tre a sei settimane) prima di apprezzarne i risultati. Purtroppo, come abbiamo già accennato, la ketamina è non solo un farmaco anestetico, ma anche una sostanza d'abuso che causa allucinazioni e sedazione e che induce dipendenza. È difficile pertanto pensare a un suo uso su larga scala.

Sono ora in corso studi clinici con antagonisti selettivi dei recettori NMDA formati solo dalle subunità GluN1 e GluN2B (ad esempio, Ro 25-6981). I risultati che emergeranno da questi studi dovrebbero permettere di valutare i rischi e i benefici dell'uso degli antagonisti NMDA nei numerosi pazienti depressi che non rispondono al trattamento con SSRI.

Come agiscono gli antagonisti dei recettori NMDA nella depressione? Perché una molecola come la ketamina che ha un'emivita di circa 2 ore riesce a ridurre la sintomatologia depressiva per almeno 3-4 giorni?

Un aumento o una diminuzione della funzione sinaptica eccitatoria si traduce non solo in variazioni ioniche, ma anche in attivazione di una serie di vie di trasduzio-

ne del segnale che controllano la neosintesi locale di proteine sinaptiche con formazione di nuove "spine" e nuove subunità recettoriali (plasticità sinaptica, vedi CD: Approfondimento 38.1). Nella corteccia frontale del cervello di ratto, la somministrazione di ketamina attiva mTOR, una proteinchinasi coinvolta fra l'altro nella regolazione della neosintesi locale di sinapsina, PSD95 e GluRA (una subunità dei recettori AMPA). Poiché l'effetto antidepressivo della ketamina è antagonizzato dalla somministrazione locale (nella corteccia frontale) di tobramicina, un inibitore della fosforilazione mediata da mTOR, è stato proposto che l'attivazione della via mTOR sia responsabile dell'azione antidepressiva della ketamina. Le proteine neosintetizzate localmente in seguito all'attivazione di mTOR hanno un'emivita di alcuni giorni. Questo spiegherebbe la lunga durata (3 giorni) dell'effetto antidepressivo della ketamina.

Per i pazienti affetti da depressione maggiore (una malattia che causa drammatiche sofferenze) forse il meccanismo d'azione del farmaco è meno importante del fatto che la molecola potrebbe ridurre le loro sofferenze. Ritengo tuttavia che accelerare l'uso clinico di questo gruppo di molecole prima di averne ben valutato il rapporto rischio/beneficio sia da non prendere in considerazione. Gli antagonisti NMDA sono comunque un'opportunità terapeutica per i depressi e sarebbe assurdo sottovalutarne l'importanza specie quando il rischio di suicidio è elevato.

■ Farmaci e neurotrasmissione eccitatoria

Purtroppo, nonostante gli enormi investimenti effettuati negli ultimi trent'anni in ambito sia accademico che industriale, varie sperimentazioni cliniche controllate hanno dimostrato che molte entità molecolari proposte per l'uso terapeutico avevano un rapporto rischio/beneficio non accettabile. In particolare, molti agonisti e antagonisti selettivi dei recettori sia ionotropi che metabotropi che avevano dato risultati brillanti in modelli cellulari o animali di neuroprotezione (ictus, trauma cranico) sono stati abbandonati dopo i primi test clinici. Fra questi sono da segnalare alcuni antagonisti dei recettori AMPA e kainato (quali i derivati chinoxalinici CNQX o DNQX) o la benzodiazepina GYKI-52466. Il loro profilo terapeutico non è favorevole a causa di effetti collaterali di una certa gravità (ad esempio, CNQX e DNQX causano, anche a basse dosi, danni ai tubuli renali). Anche molti antagonisti potenti e selettivi dei recettori NMDA, che in modelli sperimentali sembravano essere molto attivi nel ridurre il danno cerebrale post-ischemico, sono stati abbandonati sia perché causavano disturbi della percezione, sia per la scarsa efficacia terapeutica alle dosi tollerabili.

Infine, anche alcuni agonisti e antagonisti selettivi di ciascuno degli 8 sottotipi dei recettori metabotropi del glutammato sono ormai stati abbandonati dall'industria. Sappiamo tuttavia che molte sostanze "neurodeprimenti" (ad esempio, i barbiturici, l'etanolo e alcuni anestetici volatili) inibiscono fra l'altro la trasmissione eccitatoria, ma la loro specificità d'azione è molto limitata.

Solo tre molecole (Tabella 38.2), il cui principale meccanismo d'azione consiste in una modificazione funzionale

della sinapsi eccitatoria, sono state approvate per l'uso clinico. La prima è la ketamina, un anestetico generale (un tempo definito anestetico dissociativo) che è un potente antagonista non competitivo del recettore per l'NMDA; la ketamina è ancora utilizzata non solo in anestesologia veterinaria, ma anche umana in quanto può essere somministrata anche per via intramuscolare e questo può essere un vantaggio in situazioni di emergenza. Purtroppo la ketamina causa dipendenza ed è utilizzata anche come farmaco d'abuso (club drug).

La seconda è la memantina, anch'essa attiva sul complesso recettoriale NMDA-canale al Ca^{2+} . In virtù della sua scarsa affinità per il target, sembra avere un favorevole rapporto rischio/beneficio nel ridurre la progressione di alcune demenze. La memantina è l'unico inibitore del recettore per l'NMDA autorizzato per il trattamento dei pazienti con malattia di Alzheimer di grado moderato o grave. Agirebbe come un antagonista non-competitivo relativamente poco affine per il recettore per l'NMDA e ridurrebbe gli effetti deleteri di livelli patologicamente elevati di glutammato negli spazi extracellulari del cervello. Questo spiegherebbe l'apparente contraddizione insita nel suo meccanismo d'azione: mentre infatti nei soggetti sani l'antagonismo del recettore per l'NMDA inibisce sia l'apprendimento che la memoria, nei pazienti affetti da demenza il farmaco contrasta l'eccessiva stimolazione dei recettori per il glutammato limitandone gli effetti eccitotossici e rallentando la progressione della malattia. La terza infine è il riluzolo, una molecola capace di ridurre

TABELLA 38.2 Farmaci e neurotrasmissione eccitatoria

Molecola	Meccanismo d'azione	Uso clinico
Ketamina	Bloccante canale NMDA Alta affinità	Anestetico generale
Memantina	Bloccante canale NMDA Bassa affinità	Demenze
Riluzolo	Riduce liberazione glutammato	Sclerosi laterale amiotrofica Uso compassionevole

la liberazione di trasmettitore. Viene utilizzata, con poco successo terapeutico, per ridurre la progressione della sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Studi clinici controllati suggeriscono che l'uso cronico di questa molecola aumenta di qualche mese la sopravvivenza dei pazienti affetti da SLA.

Resta da segnalare che in vista dell'importanza che i recettori metabotropi sembrano avere nella funzione sinaptica, l'interesse terapeutico si è ora spostato su alcune molecole capaci di modulare in maniera allosterica i recettori mGluR. Trattasi dei cosiddetti PAM (modulatori allosterici positivi) o NAM (modulatori allosterici negativi) che potranno essere valutati in vasti settori della patologia neurologica o psichiatrica (ad esempio, nell'ansia, nella depressione, nella schizofrenia, nelle tossicodipendenze, nei dolori cronici, in alcune forme epilettiche, nei disturbi dell'apprendimento, nell'ictus e nelle malattie neurodegenerative).

Nel box 38.1 vengono riassunti i meccanismi della neurotrasmissione mediata da acido glutammico.

BOX 1 La neurotrasmissione mediata da acido glutammico

- ▶ L'acido glutammico è il più abbondante trasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale. Esso viene sintetizzato dal glucosio e dalla glutammina e si trova molto concentrato nelle vescicole sinaptiche.
- ▶ L'acido glutammico può agire sia su recettori ionotropi che su recettori associati a proteine G (recettori metabotropi). I recettori ionotropi si dividono in recettori NMDA (che mediano l'apertura di un peculiare canale al calcio), recettori AMPA e recettori kainato (che mediano l'apertura di un canale al sodio). I recettori metabotropi possono essere classificati in recettori associati all'attivazione della fosfolipasi C e recettori associati all'inibizione dell'adenilciclasi.
- ▶ I recettori AMPA e kainato sono responsabili della trasmissione sinaptica rapida. I recettori NMDA, con la loro peculiare sensibilità al voltaggio di membrana in presenza di ioni Mg^{2+} , sono coinvolti nella plasticità sinaptica, che è alla base dei meccanismi di apprendimento e di memoria. Anche i recettori metabotropi sembrano coinvolti nei fenomeni di plasticità sinaptica.
- ▶ Un'eccessiva concentrazione di glutammato negli spazi extracellulari del sistema nervoso centrale può portare a morte i neuroni. Tale morte è definita eccitotossica e sembra avere un ruolo nella perdita di neuroni causata da fenomeni ischemici, ipoglicemici e anche dopo prolungati attacchi convulsivi e in alcune forme demenziali.
- ▶ È possibile antagonizzare il recettore NMDA sia agendo sul sito di riconoscimento del glutammato, o sul sito di riconoscimento della glicina che è un coagonista di questo recettore (ad esempio, con i derivati dell'acido chinurenico), sia bloccando il canale al calcio (ad esempio con ketamina, MK801, fenciclidina). È inoltre possibile antagonizzare i recettori di tipo AMPA e kainato con delle chinoline (ad esempio, CNQX o DNQX) e con degli antagonisti non-competitivi (ad esempio, GYKI-52-466).
- ▶ Gli antagonisti dei recettori NMDA sembrano essere efficaci nel prevenire alcune forme convulsive e riducono la morte neuronale causata da ischemia. Un antagonista non-competitivo dei recettori NMDA, la memantina, si è dimostrato efficace nel ridurre la progressione di forme demenziali. Un altro, la ketamina, usato da decenni come anestetico e farmaco d'abuso, sembra efficace nella depressione.
- ▶ Sono in sperimentazione clinica vari agonisti, antagonisti e modulatori selettivi dei recettori metabotropi che potrebbero essere utilizzati in vaste aree della patologia neurologica e psichiatrica.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Il glutammato è molto concentrato nelle vescicole delle sinapsi eccitatorie del SNC e la sua liberazione attiva due classi di recettori: recettori ionotropi (canali) e recettori metabotropi (associati a proteine G).
- ▶ Un'eccessiva liberazione di glutammato o comunque un'eccessiva stimolazione dei recettori per questo amminoacido (ad esempio, dei recettori NMDA) può portare i neuroni a morte (eccitotossicità).
- ▶ Agonisti, antagonisti e modulatori dei recettori per il glutammato sono stati proposti per la terapia di vasti settori della patologia neurologica e psichiatrica (ictus, demenze, morbo di Parkinson, convulsioni ed epilessia, malattie psichiatriche).
- ▶ Solo tre farmaci capaci di modificare selettivamente la sinapsi glutammatergica sono clinicamente utilizzati: ketamina (anestetico), memantina (terapia del deterioramento cognitivo) e riluzolo (sclerosi laterale amiotrofica). La loro utilità nella pratica medica non è particolarmente rilevante.

Bibliografia essenziale

- ▶ Nicoletti F, Bockaert J, Collingridge GL et al. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Neuropharmacology* 2011;60:1017-41. Epub 2010 Oct 29.
- ▶ Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:295-322.
- ▶ Sheldon AL, Robinson MB. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 2007;51:333-55.
- ▶ Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 2010;62:405-96.
- ▶ Urwyler S. Allosteric Modulation of Family C G-Protein-Coupled Receptors: from Molecular Insights to Therapeutic Perspectives. *Pharmacol Rev* 2011;63:59-126.

La trasmissione purinergica

Stefania Ceruti, Flaminio Cattabeni, Maria Pia Abbracchio

Obiettivi formativi

- Analizzare le vie di rilascio, di metabolismo e di catabolismo dei nucleotidi e dei nucleosidi purinici e pirimidinici, il loro ruolo come neurotrasmettitori e neuromodulatori e le loro azioni recettoriali e non-recettoriali su vari organi e sistemi
- Evidenziare la struttura molecolare, la farmacologia, i meccanismi di segnalazione e gli effetti mediati dai recettori purinergici P1 e P2 nei sistemi nervoso, cardiovascolare, respiratorio e immunitario
- Comprendere il meccanismo d'azione di farmaci antiplatestrici già noti (come dipiridamolo, ticlopidina e clopidogrel) e di principi attivi naturali (quali caffeina, teofillina e teobromina) e discutere il razionale grazie al quale alcuni specifici recettori P1 o P2 rappresentano bersagli farmacologici innovativi per lo sviluppo di terapie per la trombosi, la fibrosi cistica, il morbo di Parkinson, il dolore neuropatico e gli eventi neurodegenerativi acuti e cronici

Le purine: da precursori metabolici a neurotrasmettitori

Da decenni è noto il ruolo delle purine (nucleosidi e nucleotidi adeninici, quali adenosina e adenosina trifosfato, ATP) nel metabolismo energetico e nella sintesi degli acidi nucleici, ma solo di recente ne è stato dimostrato un ruolo nella segnalazione intercellulare. La prima dimostrazione a favore di un'attività specifica delle purine risale al 1929, quando Drury e Szent-Gyorgyi ne descrissero le potenti azioni vasodilatanti e bradicardiche. Questa osservazione doveva però rimanere isolata fino al 1963, quando fu dimostrata la produzione di adenosina dal cuore ipossico e ne fu ipotizzato il coinvolgimento nella regolazione del flusso ematico coronarico. La successiva dimostrazione che le azioni di adenosina erano bloccate dalla metilxantina caffeina suggerì che esse fossero mediate da recettori di membrana specifici sui quali le metilxantine si comportavano da antagonisti. Parallelamente, l'ipotesi che ATP svolgesse un ruolo chiave nella neurotrasmissione fu corroborata da studi condotti da Burnstock, che nel 1972 propose ATP quale ipotetico trasmettitore delle sinapsi "non-colinergiche e non-adrenergiche" del sistema nervoso autonomo. La "teoria purinergica" trovò inizialmente scarso credito, in quanto risultava difficile credere che molecole ubiquitarie fino a quel momento meri precursori metabolici potessero anche partecipare a eventi così altamente specifici quali

la neurotrasmissione. Negli anni successivi, numerose evidenze hanno confermato che adenosina e ATP sono importanti regolatori dell'omeostasi del sistema nervoso centrale e periferico, cardiovascolare, respiratorio, renale e immunitario, e hanno evidenziato il loro ruolo in condizioni di emergenza quali l'ischemia cerebrale e miocardica, l'attacco epilettico e le infezioni, nelle quali queste molecole fungono da "segnalatori di pericolo". È inoltre accertato che alterazioni del sistema purinergico svolgono un ruolo nella patogenesi di molte malattie umane, quali morbo di Alzheimer, sclerosi multipla, deficit immunitari e tumori. Infine, la caratterizzazione dei recettori "purinergici" ha permesso di dimostrare che essi sono attivabili anche da derivati pirimidinici quali UTP e UDP (e più recentemente, pirimidine legate a zuccheri come UDP-glucosio e UDP-galattosio) (Figura 39.1), estendendo anche a questi composti l'ipotesi neurotrasmettitoriale. L'esistenza della "trasmissione purinergica" è oggi universalmente accettata, e con questo termine ci si riferisce in generale alla comunicazione intercellulare sostenuta sia da derivati purinici che pirimidinici.

Le purine sono colocalizzate con un gran numero di trasmettitori

Le purine sono colocalizzate con neurotrasmettitori "classici" nelle sinapsi del sistema nervoso centrale e periferico. Sono inoltre immagazzinate nei granuli di alcune cellule circolanti, quali le piastrine. Gli effetti

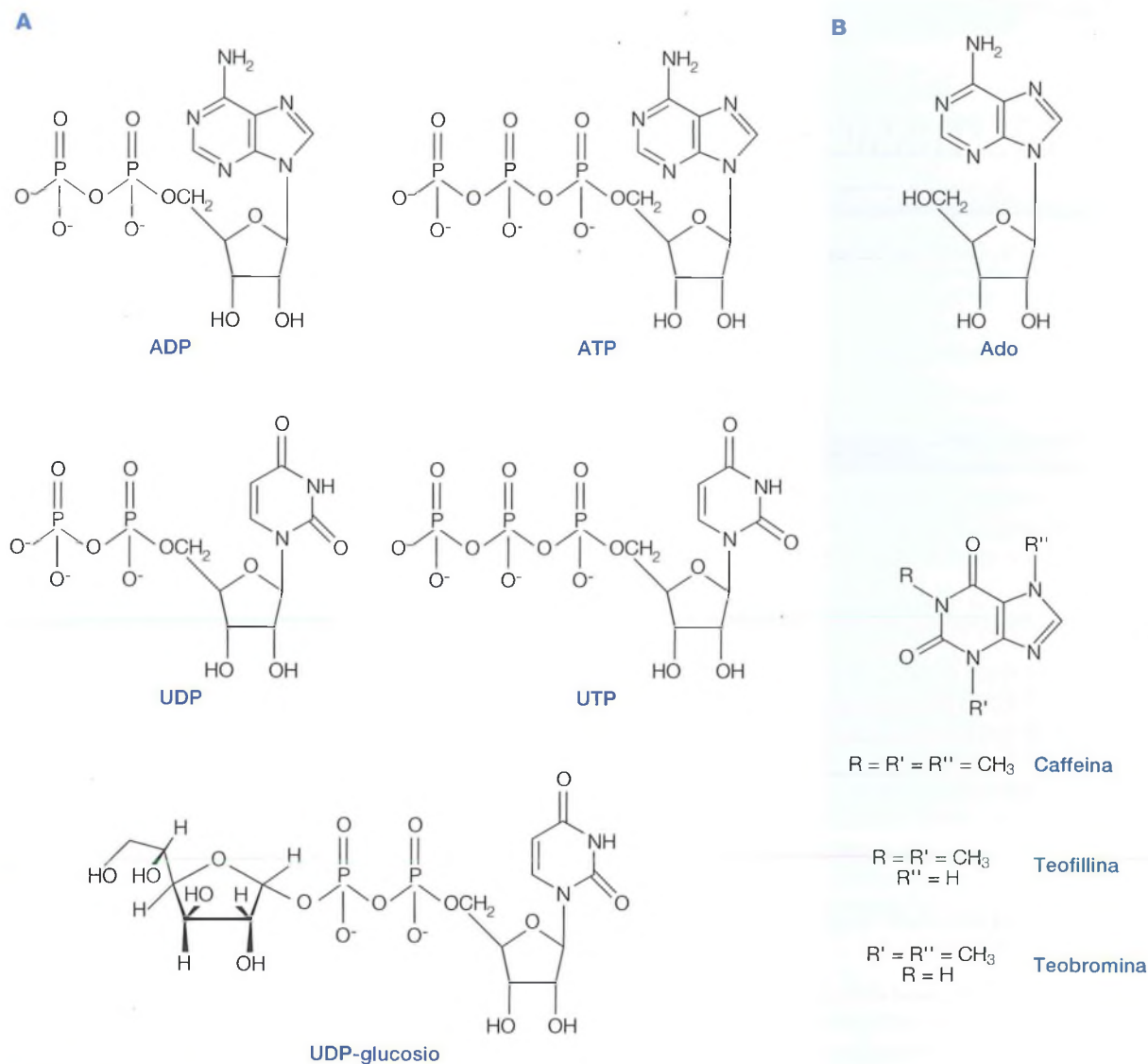


FIGURA 39.1 Struttura chimica dei composti trattati in questo capitolo. **A.** Nucleotidi purinici (ADP e ATP) e pirimidinici (UDP, UTP e UDP-glucosio). **B.** Adenosina (Ado) e derivati xantini ad azione antagonista sui recettori P1 (caffeine, teofillina e teobromina).

delle purine sono dovuti in parte a modulazione degli effetti evocati dai trasmettitori con cui sono corilasciate, in parte all'attivazione di recettori purinergici localizzati su tessuti e organi bersaglio, e, nel caso del sistema centrale e periferico, a modulazione del rilascio dagli stessi terminali, grazie alla presenza di recettori presinaptici. Ulteriori elementi che aggiungono complessità a questo sistema sono:

- il neurotrasmettitore non è unico ma si tratta in realtà di una famiglia di composti biologicamente attivi (ATP, ADP, adenosina) che possono generarsi per idrolisi successiva a partire da ATP (Figura 39.2);
- la sorgente di questi neurotrasmettitori non è unicamente neuronale o piastrinica in quanto essi possono essere rilasciati ubiquitariamente anche da altri tessuti soprattutto in condizioni di emergenza metabolica.

Questi fattori, uniti alla difficoltà di distinguere chiaramente le purine "trasmettitoriali" da quelle coinvolte nei processi cellulari energetici, di sintesi degli acidi nucleici, di catalisi enzimatica e di attività metaboliche in generale, hanno reso particolarmente difficile l'identificazione di vie di trasmissione purinergiche.

Fonti, metabolismo e rilascio delle purine

In questo capitolo saranno descritte le modalità che regolano la formazione, il metabolismo e il rilascio delle purine coinvolte nei processi di neurotrasmissione. Non saranno trattati i processi di biosintesi, catabolismo e interconversione relativi al ruolo più generico dei nucleotidi

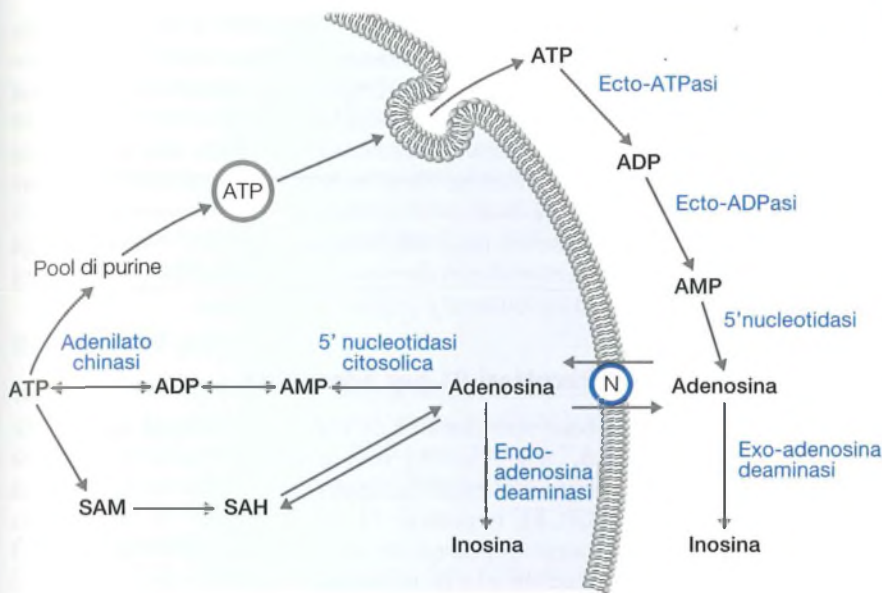


FIGURA 39.2 Sintesi e metabolismo delle purine. ATP rilasciato per esocitosi o forse anche attraverso un trasportatore specifico di membrana è metabolizzato nello spazio extracellulare ad ADP, AMP e adenosina a opera di ectoenzimi. L'inattivazione di adenosina può avvenire per deaminazione a inosina per opera della *exo-adenosina-deaminasi* o per ricaptazione all'interno della cellula tramite il trasportatore nucleosidico simmetrico (N) che permette il riciclo di adenosina nel *pool* delle purine intracellulari a seguito della sua rifosforilazione. Oltre che da ATP, adenosina può anche essere prodotta intracellularmente da *S-adenosilmetionina* (SAM) attraverso la formazione di *S-adenosilomocisteina* (SAH).

purinici nel metabolismo cellulare (per i quali si rimanda il lettore a testi classici di biochimica), se non per l'importanza che il *pool* metabolico delle purine può rivestire in condizioni di emergenza associate a ischemia e ipossia (vedi **CD**: Approfondimento 39.1. *Purine e ischemia*).

ATP è concentrato in vescicole o granuli con altri trasmettitori

Nelle piastrine i nucleotidi adeninici sono accumulati sotto forma di aggregati densi da cui sono rilasciati mediante esocitosi durante l'attivazione piastrinica. Anche nei terminali presinaptici del sistema nervoso ATP è immagazzinato nelle vescicole sinaptiche in associazione con neurotrasmettitori "classici", quali noradrenalina, acetilcolina, dopamina, serotonina, aminoacidi eccitatori e peptidi. Nei terminali del sistema nervoso periferico vegetativo, catecolamine e ATP sono concentrati nelle vescicole in rapporto molare di 4:1. Non è ancora del tutto chiaro se nelle terminazioni nervose venga anche accumulata adenosina come tale. In condizioni fisiologiche, il rilascio di purine dai terminali avviene esclusivamente dal *pool* vescicolare con un meccanismo calcio-dipendente. In condizioni di emergenza (ad esempio, ipossia), in conseguenza delle alterazioni della permeabilità della membrana plasmatica (e, in casi estremi, della sua lisi), il rilascio di purine avviene anche dal *pool* metabolico non solo delle cellule nervose, ma anche delle cellule endoteliali, muscolari, globuli rossi, e di qualunque tipo cellulare danneggiato dall'insulto citotossico. Nell'area ischemica/ipossica o traumatica, si registrano incrementi notevoli delle concentrazioni locali di purine e pirimidine anche a causa della degradazione degli acidi nucleici rilasciati dalle cellule morte (vedi **CD**: Approfondimento 39.1).

L'idrolisi di ATP produce metaboliti attivi

Dopo il rilascio, ATP è substrato di enzimi denominati ecto-ATPasi (ecto-nucleotidasi) che lo degradano sequen-

zialmente ad ADP, AMP e adenosina (Figura 39.2). Tutti questi metaboliti sono in grado di attivare, con diversa efficacia, i vari tipi di recettori purinergici. La recente scoperta che anche i nucleotidi pirimidinici di- e trifosfato (UTP, UDP) e, più recentemente, UDP-glucosio e UDP-galattosio possano essere substrato di questi ectoenzimi e possano attivare recettori a G-proteina (GPCR) responsivi ad ATP e ADP suggerisce che anche queste molecole, oltre ai ben noti ruoli nel metabolismo, possano fungere da mediatori intercellulari. Anche se le modalità di rilascio e catabolismo dei nucleotidi uridinici sono molto meno conosciute, è probabile che avvengano in maniera simile a quanto descritto per ATP; nel caso di UTP (particolarmente concentrato negli eritrociti circolanti), il prodotto catabolico finale è uridina, che non sembra però conservare alcuna attività biologica. Sia UTP che UDP sono attivi sui recettori purinergici P2, anche se spesso con profili di risposta diversi da quelli dei nucleotidi adeninici.

Adenosina è degradata nel metabolita inattivo inosina dall'enzima *exo-adenosina-deaminasi* (ADA). La concentrazione extracellulare di adenosina viene ridotta anche per ricaptazione tramite trasportatori specifici bloccati da dilazep e dipiridamolo. Si ritiene che questi agenti farmacologici possano avere effetti benefici nell'ischemia cerebrale e cardiaca grazie al potenziamento degli effetti recettoriali di adenosina conseguente l'aumentata disponibilità del nucleoside nello spazio extracellulare. In condizioni fisiologiche, il meccanismo più importante per l'eliminazione di adenosina dallo spazio intersinaptico sembra essere la ricaptazione, mentre la deaminazione extracellulare assume rilevanza in condizioni di elevate concentrazioni del nucleoside come in corso di patologie ischemiche.

A seguito della sua ricaptazione, adenosina viene fosforilata ad AMP da una *adenosina chinasi* intracellulare che ne consente il riciclo nel *pool* cellulare di purine; adenosina intracellulare può essere anche deaminata a

inosina da una endo-ADA. I valori di K_m degli enzimi adenosino-chinasici sono molto più bassi di quelli delle endo-ADA; per questo motivo si ritiene che in condizioni normali la maggior parte del nucleoside ricaptato venga fosforilato a riformare ATP, mentre in condizioni patologiche caratterizzate da massicci aumenti della concentrazione intracellulare di adenosina, la deaminazione diventi la reazione predominante. Come si può notare dalla figura 39.2, adenosina intracellulare può anche derivare dall'idrolisi di S-adenosil-omocisteina (SAH) e dall'idrolisi di ATP. Mentre in condizioni fisiologiche adenosina sembra essere prodotta principalmente dall'idrolisi di SAH, in condizioni di ipossia e ischemia la via metabolica principale è l'idrolisi di ATP.

È infine di notevole interesse la dimostrazione recente che la concentrazione tissutale degli enzimi ecto-nucleotidasi aumenta notevolmente in alcune condizioni particolari (ad esempio, durante la neurogenesi) o durante la riparazione di un danno (ad esempio, dopo ipossia o trauma cerebrali); ciò suggerisce un ruolo fondamentale per nucleotidi e nucleosidi nella migrazione delle cellule staminali embrionali, nel loro differenziamento terminale e nel reclutamento di cellule staminali adulte a seguito di eventi traumatici.

Recettori per le purine

Nel 1978, Burnstock propose l'esistenza di due tipi di recettori per le purine, che denominò P1 (se attivati da

adenosina) e P2 (se attivati da ATP). I recettori P1 sono inibiti competitivamente da xantine quali caffeina, teofillina e teobromina (Figura 39.1), totalmente inattive sui recettori P2. Questa suddivisione generale in recettori P1 e P2 è ancora mantenuta ed è stata la base per l'attuale classificazione e nomenclatura di questi recettori (Figure 39.3 e 39.4).

Ciascuna delle due famiglie comprende diversi sottotipi recettoriali con distinta struttura molecolare, meccanismi di trasduzione e profilo farmacologico.

Recettori P1 per adenosina

Sono stati clonati e caratterizzati 4 distinti recettori P1: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , tutti accoppiati a proteine G. Come tutti i recettori accoppiati a proteine G (denominati GPCR), i recettori P1 sono costituiti da una singola catena peptidica che attraversa 7 volte la membrana. I recettori A_1 e A_3 inibiscono e quelli A_2 (sia A_{2A} che A_{2B}) stimolano l'attività adenilil ciclasica, attraverso proteine G_i e G_s , rispettivamente. In alcuni tessuti, i recettori A_1 e A_3 stimolano anche l'attività della fosfolipasi C, e il recettore A_1 può anche agire su canali ionici per Ca^{2+} o K^+ , grazie alla sua capacità di interagire con vari sottotipi di proteine G_i e G_o .

I recettori A_1 , A_2 e A_3 differiscono, talvolta in modo marcato, per quel che riguarda la distribuzione nell'organismo, per gli effetti da essi evocati (Tabella 39.1) e per il diverso profilo di risposta farmacologica ad analoghi non idrolizzabili di adenosina. La struttura chimica di

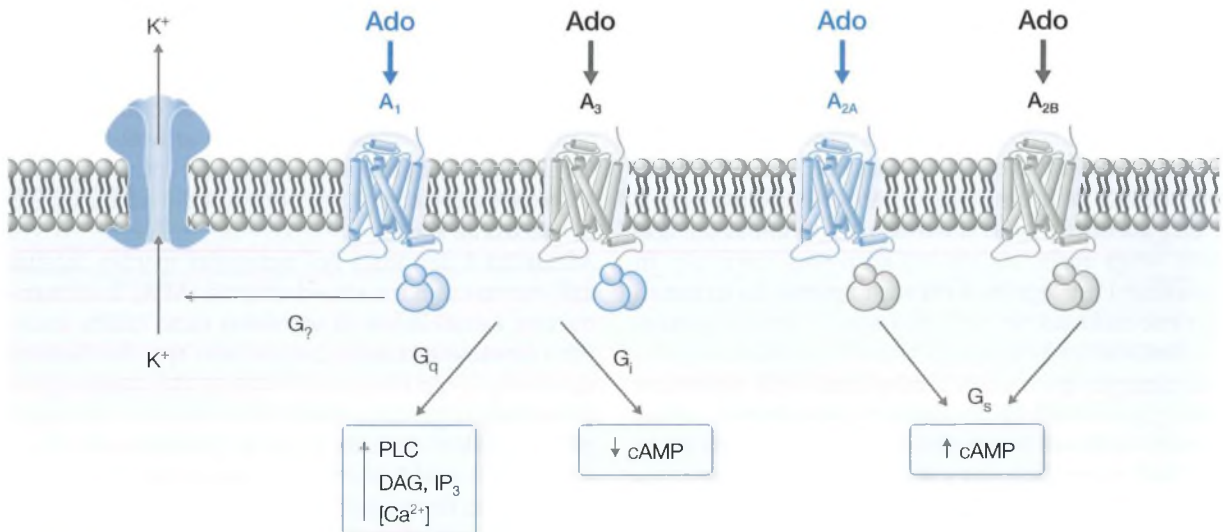


FIGURA 39.3 Recettori P1 per adenosina. Si riconoscono 4 sottotipi di recettori P1 che rispondono ad adenosina (denominati A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3). I sottotipi A_1 e A_{2A} vengono attivati da basse concentrazioni (nanomolari) del nucleoside endogeno, che si possono riscontrare nei tessuti in condizioni fisiologiche, mentre i sottotipi A_{2B} e A_3 sono preferenzialmente attivati da concentrazioni micromolari di adenosina e vengono quindi reclutati prevalentemente in condizioni patologiche, quando si osserva un marcato aumento dei livelli extracellulari di purine. I sottotipi A_1 e A_3 sono accoppiati sia a inibizione dell'adenilil ciclasasi con diminuzione dei livelli di cAMP, che a stimolazione della fosfolipasi C, con conseguente aumento della produzione di IP_3 e mobilizzazione del calcio dai depositi intracellulari. Inoltre, attraverso l'accoppiamento a una G-proteina non ancora identificata, il sottotipo A_1 è anche in grado di promuovere la fuoriuscita di ioni potassio dal citoplasma, con conseguente iperpolarizzazione della membrana cellulare. I sottotipi A_{2A} e A_{2B} sono invece generalmente accoppiati a G-proteine della famiglia G_s , che stimolano l'attività dell'adenilil ciclasasi e la produzione di cAMP.

adenosina è riportata nella figura 39.1; inserendo vari sostituenti sia sull'anello purinico che sul residuo ribosidico si è arrivati alla sintesi di molecole con diverse affinità e selettività per i vari sottotipi recettoriali. Analogamente, i primi antagonisti sono stati ottenuti modificando la struttura delle xantine naturali, quali teofillina (Figura 39.1), mentre più recentemente sono state sintetizzate molecole con struttura chimica diversa ma dotate anch'esse di potente attività antagonista.

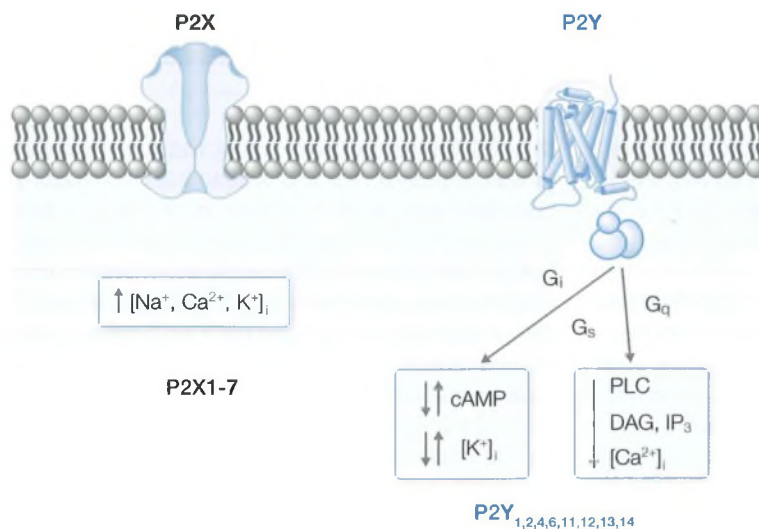
Recettori P2 per ATP

In base alla loro topologia di membrana e al meccanismo di trasduzione, si riconoscono due grosse sottofamiglie di recettori P2: recettori-canale (P2X) e recettori a G proteina (P2Y), che a loro volta comprendono vari sottotipi.

Recettori-canale P2X

I recettori P2X mediano le risposte veloci e transienti ad ATP e partecipano alle risposte depolarizzanti nei tessuti eccitabili. Sono canali permeabili a cationi (Na^+ , Ca^{2+} , K^+), e sono inibiti dalla sostanza tripanocida suramina e, in alcuni casi, da PPADS (acido piridossalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonico). Il clonaggio dei 7 recettori P2X (P2X1-7) ha portato alla scoperta di una nuova struttura di recettore-canale. Ci si aspettava infatti che questi recettori avessero un'organizzazione simile a quella già nota per altri recettori ligando-operati, quali i recettori colinergici nicotinici o quelli glutammatergici. Invece i recettori P2X mostrano

un'organizzazione molecolare molto più simile a quella dei canali epiteliali per il Na^+ amiloride-sensibili, e a quella di alcuni canali per il K^+ : solo due domini transmembrana, entrambe le estremità amminica e carbossilica citoplasmatiche e una grossa ansa extracellulare (Figura 39.4). Questo ha permesso di formulare l'affascinante ipotesi secondo la quale ATP possa essere stato il primo vero trasmettitore chimico usato dalla cellula per comunicare con l'ambiente esterno: per trasmettere il proprio messaggio, ATP avrebbe utilizzato e "perfezionato" un canale ionico già espresso anche da cellule molto primitive. Nel 1992 è stata riportata la prima evidenza diretta della partecipazione di ATP alla neurotrasmissione eccitatoria nel sistema nervoso centrale ed è oggi noto che questa attività è mediata dalla depolarizzazione veloce indotta dai recettori P2X (Tabella 39.2). Questa risposta è anche alla base di vari effetti indotti da ATP, quali la nocicezione, l'induzione di *Long-Term Potentiation* (LTP) nell'ippocampo, area deputata all'apprendimento e alla memorizzazione, le risposte contratturanti sulla muscolatura liscia vasale e viscerale, l'inotropismo e cronotropismo positivo a livello cardiaco, nonché di svariati altri effetti ancora in fase di caratterizzazione, come suggerito dalla vasta distribuzione di questi recettori nell'organismo (Tabella 39.2). Per ottenere un recettore P2X pienamente funzionale è necessario che 3 subunità si assemblino a costituire il canale ionico e negli ultimi anni è emerso chiaramente che questi trimeri recettoriali possono essere costituiti da subunità P2X diverse (ad esempio,



Specificità farmacologica dei recettori P2Y

Attivati da nucleotidi adeninici
P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃

Attivati da nucleotidi uridinici
P2Y₆, P2Y₁₄

Selettività mista
P2Y₂, P2Y₄

Attivati da nucleotidi uridinici coniugati a zuccheri
P2Y₁₄

FIGURA 39.4 Recettori P2 per i nucleotidi. I recettori P2X sono recettori canale che consentono l'ingresso nella cellula di ioni mono- e bivalenti (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}). Mediano quindi risposte rapide e di tipo eccitatorio. Sono stati clonati e caratterizzati 7 sottotipi di recettori P2X (numerati da 1 a 7), che possono costituire omo- o etero-dimeri nella membrana cellulare (vedi testo). I recettori P2Y sono recettori a 7 domini transmembrana accoppiati a G-proteine. Attualmente nei mammiferi sono riconosciuti ufficialmente 8 sottotipi di recettori P2Y (denominati P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}), che possono essere suddivisi sia in base al meccanismo di trasduzione a essi associato che in base al tipo di ligando endogeno da cui vengono attivati. Per quanto riguarda i meccanismi di trasduzione, i recettori del gruppo I (cioè P2Y_{1,2,4,6,11}) sono generalmente accoppiati a proteine G_q , con conseguente stimolazione della PLC, produzione di IP_3 e rilascio di calcio dai depositi intracellulari del reticolo endoplasmatico. Il sottotipo P2Y₁₁ (di cui non è stato identificato l'ortologo nel roditore) può anche essere accoppiato a stimolazione dell'adenilil ciclasi attraverso una proteina G_s . I recettori P2Y appartenenti al cosiddetto gruppo II (P2Y_{12,13,14}) sono invece accoppiati a una proteina G_i , con conseguente inibizione dell'adenilil ciclasi e riduzione dei livelli intracellulari di cAMP.

TABELLA 39.1 Effetti biologici indotti da adenosina*

Effetti		Sottotipo recettoriale
Sistema nervoso centrale	<i>Inibizione del rilascio di neurotrasmettitori</i>	A ₁
	<i>Sedazione</i>	A ₁
	<i>Riduzione dell'attività motoria</i>	A _{2A}
	<i>Attività anticonvulsivante</i>	A ₁
	<i>Stimolazione dei chemorecettori</i>	A _{2A}
Sistema cardiovascolare	<i>Vasodilatazione</i>	A _{2A} , A _{2B} , A ₃
	<i>Vasocostrizione</i>	A ₁
	<i>Bradycardia</i>	A ₁
	<i>Inotropismo negativo</i>	A ₁
	<i>Inibizione piastrinica</i>	A _{2A}
Sistema renale	<i>Riduzione della filtrazione glomerulare</i>	A ₁
	<i>Inibizione della diuresi</i>	A ₁
	<i>Inibizione del rilascio di renina</i>	A ₁
Sistema respiratorio	<i>Broncodilatazione</i>	A ₂
	<i>Broncocostrizione</i>	A _{1A} , A _{2B} , A ₃
	<i>Controllo della secrezione degli ioni cloro</i>	A ₁ , A _{2B}
Sistema immunitario	<i>Immunosoppressione</i>	A _{2A}
	<i>Chemotassi dei neutrofili</i>	A ₁
	<i>Generazione di ioni superossido</i>	A _{2A}
	<i>Degranulazione dei mastociti</i>	A _{2B} , A ₃
Sistema gastrointestinale	<i>Inibizione della secrezione acida</i>	A ₁
Metabolismo	<i>Inibizione della lipolisi</i>	A ₁
	<i>Aumento della sensibilità all'insulina</i>	A ₁
	<i>Stimolazione della gluconeogenesi</i>	A ₂

* In corsivo le azioni più importanti

P2X2 e P2X3 con stechiometria variabile). Questi eteromeri possono avere proprietà farmacologiche e funzionali diverse rispetto al recettore costituito da 3 subunità identiche, aggiungendo quindi ulteriore complessità al sistema.

Particolarmente interessante è il recettore P2X3: l'espressione selettiva di questo recettore nei neuroni sensoriali della radice dorsale delle corna spinali (dove media la trasmissione dei segnali nocicettivi spesso come eteromero con il sottotipo P2X2) lo rende un bersaglio farmacologico interessante per lo sviluppo di farmaci analgesici dotati di nuovo meccanismo d'azione e verosimilmente privi di effetti collaterali. Anche il recettore P2X7 (noto in precedenza come recettore P2z) suscita interesse, in quanto ritenuto responsabile della morte cellulare da apoptosi indotta dai derivati di ATP. Infatti, a concentrazioni fisiologiche di ATP, questo recettore si comporta come un normale canale ligando-operato. Invece, quando viene attivato ripetutamente o da elevate concentrazioni di ATP, costituisce un poro di membrana di notevoli dimensioni e relativamente poco selettivo. La sua attivazione porta quindi a massiccio ingresso di Na⁺ e/o Ca²⁺ nella cellula, con conseguente morte per necrosi

(lisi cellulare) o apoptosi (morte ritardata da accumulo di Ca²⁺). Questo recettore è tipico del mastocita e del macrofago ed è stato di recente identificato anche sulle cellule microgliali. La scoperta che questo recettore è anche espresso dalle cellule tumorali fa ritenere che esso possa svolgere un ruolo cruciale nel controllo naturale della trasformazione neoplastica. È stato infatti ipotizzato che alcune cellule immunitarie possano indurre l'espressione nelle cellule trasformate, e, dopo averle ingaggiate, provocarne la morte attraverso il rilascio di massicce quantità di ATP. Sono stati di recente sintetizzati ligandi che si comportano da agonisti/antagonisti selettivi per i vari recettori P2X.

Recettori P2Y accoppiati a G-proteina

I recettori P2Y sono recettori ubiquitari particolarmente abbondanti in cervello, vasi, rene, pancreas endocrino e fegato. Nei mammiferi vengono attualmente riconosciuti 8 distinti sottotipi recettoriali: i recettori P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}, caratterizzati da omologia di sequenza relativamente bassa (40-60%) e da diversità nel profilo di risposta ai nucleotidi adeninici (ATP, ADP), uridinici (UTP, UDP), ai polifosfati di diadenosina (APxA), o ai

TABELLA 39.2 Effetti biologici indotti da ATP e da altri nucleotidi extracellulari*

Effetti		Sottotipo recettoriale
Sistema nervoso centrale	<i>Inibizione del rilascio di neurotrasmettitori</i>	P2Y _{2,4}
	Attivazione dei neuroni	P2X
	Attivazione degli astrociti	P2Y
	<i>Nocicezione</i>	P2X ₃ , P2Y ₂
Sistema nervoso periferico	<i>Modulazione della neurotrasmissione in gangli sensoriali e intrinseci in vari organi</i>	P2Y ₂
	Modulazione pre- e post-giunzionale della neurotrasmissione nelle giunzioni neuroeffetttrici	P2Y
Sistema cardiovascolare	<i>Vasodilatazione</i>	P2Y _{1,2,4}
	Inotropismo positivo	P2X ₇ , P2Y _{2,6,11}
	<i>Attivazione piastrinica</i>	P2Y ₁ , P2Y ₁₂
Muscolatura liscia	Contrazione	P2X
	Rilassamento (intestino, vasi)	P2Y
Sistema respiratorio	<i>Secrezione di mucina e di surfactante</i>	P2Y ₂ (P2Y ₆)
	Vasocostrizione polmonare	P2X ₇
Sistema immunitario	Attivazione dei linfociti	P2X ₇ ?
	<i>Secrezione di istamina da mastociti</i>	P2X ₇
	Regolazione del differenziamento cellulare	P2Y ₁₄ , P2Y ₁₁
Sistema endocrino	<i>Induzione di secrezione pancreatica di insulina</i>	P2Y
Sistema gastroenterico	Induzione di secrezione acida gastrica	P2Y ₇
	Inibizione motilità intestinale	P2Y
	<i>Trasporto di sali e fluidi nell'epitelio duodenale</i>	P2Y ₄
Sistema renale	Vasocostrizione delle arteriole afferenti	P2X
	Induzione di secrezione di renina	P2Y ₁₁ ?
Sistema muscolo-scheletrico	<i>Aumentata attività degli osteoblasti e apoptosi degli osteoclasti</i>	P2X ₇
	Riduzione della mineralizzazione ossea	P2Y ₂
Metabolismo	<i>Modulazione del trasporto di colesterolo</i>	P2Y ₁₃

* In corsivo le azioni più importanti sulla base delle conoscenze attuali

nucleotidi legati a zuccheri (UDP-glucosio e UDP-galattosio) (Figura 39.4). Questi recettori sono primariamente associati a proteine Gq (nel qual caso attivano la PLC) e a proteine Gi (nel qual caso inibiscono l'adenilil ciclasi e forse modulano la fosfolipasi A2). I recettori "mancanti" nella sequenza numerica corrispondono a recettori clonati da non-mammiferi (i cui ortologhi di mammifero non sono ancora noti), a recettori non ancora caratterizzati farmacologicamente, o a recettori assegnati erroneamente in precedenza alla famiglia P2Y.

È probabile che vi siano ancora diversi recettori P2Y da clonare. Sono state infatti riportate risposte ai nucleotidi mediate da GPCR con caratteristiche farmacologiche diverse da quelle dei recettori già clonati. Inoltre, l'analisi della sequenza completa del genoma umano ha rivelato un numero totale di GPCR fra 700 e 1000, e svariate di queste sequenze per cui non è ancora stato identificato il ligando endogeno (i cosiddetti recettori "orfani") mostrano somiglianza strutturale con recettori P2Y noti.

Benché molti dei recettori P2Y siano antagonizzati da suramina e PPADS, non esistono al momento agonisti o antagonisti realmente selettivi per i vari sottotipi, con l'unica eccezione dei recettori P2Y₁, P2Y₂ e P2Y₁₂

(vedi CD: Approfondimento 39.2. *Farmaci attivi sul sistema purinergico attualmente in sviluppo*). È in corso in questi anni un'intensa attività di sintesi per l'ottenimento di nuovi derivati selettivi e resistenti alle ecto-ATPasi.

Fra i recettori caratterizzati (Tabella 39.2), il recettore P2Y₂ attivato sia da ATP che da UTP e abbondantemente espresso negli epitelii respiratori (dove è responsabile della regolazione della secrezione di sali e fluidi) ha di recente acceso grossi entusiasmi, in quanto questi nucleotidi sono gli unici composti capaci di normalizzare la secrezione degli epitelii respiratori in pazienti portatori di fibrosi cistica. Nel 2003, è stato dimostrato un ruolo analogo per il recettore P2Y₄ nella regolazione del trasporto di sali e fluidi a livello intestinale, suggerendo che alterazioni della funzione di questo recettore possano svolgere un ruolo nelle patologie ostruttive intestinali e che agonisti P2Y₄-selettivi possano rappresentare nuovi agenti farmacologici per il trattamento di queste disfunzioni.

Notevole interesse è rivolto anche al recettore P2Y delle cellule del pancreas endocrino, la cui attivazione stimola il rilascio di insulina migliorando la tolleranza al glucosio in pazienti diabetici.

Nel 2001 è stato finalmente clonato il recettore P2Y₁₂ (precedentemente noto come P2₁, ora ribattezzato P2Y₁₂); questo recettore è associato a inibizione dell'attività adenilciclasica ed è responsabile dei potenti effetti pro-aggreganti indotti da ADP. È interessante notare che ATP è in grado di antagonizzare l'attivazione prodotta da ADP e che farmaci antiplastrinici già in commercio da anni (ticlopidina e clopidogrel) e altri attualmente in sviluppo (ad esempio, ticagrelor) devono la loro attività antitrombotica proprio all'antagonismo esercitato su questo recettore.

Nel 2003 è stato anche riconosciuto come nuovo membro della famiglia il recettore responsivo a UDP-glucosio e UDP-galattosio (P2Y₁₄). Questo recettore è indotto da stimoli immunologici e ne è stata di recente dimostrata l'espressione (e la capacità di indurre chemotassi) in cellule progenitrici in grado di differenziarsi a cellule ematopoietiche. Questa scoperta potrebbe avere importanti implicazioni per l'impiego delle cellule staminali nelle malattie umane. È interessante notare che la sequenza nucleotidica di questo recettore era già presente da diversi anni come GPCR "orfano" nelle banche-dati umane; l'identificazione dei suoi ligandi naturali rappresenta un ottimo esempio di come la "de-orfanizzazione" dei recettori orfani possa contribuire a individuare nuovi bersagli di interesse farmacologico per le malattie umane. Anche il recettore P2Y₁₃ sembra svolgere ruoli importanti nel sistema immunitario. Recentemente, grazie a studi condotti su animali knockout per questo recettore, è stato messo in evidenza il ruolo importante di questo recettore nel favorire il trasporto inverso del colesterolo, un effetto che potrebbe essere sfruttato terapeuticamente per promuovere l'eliminazione del colesterolo e migliorare così il profilo lipidico nei soggetti con ipercolesterolemia.

Il recettore P_{2D} deve la sua sigla al fatto di essere attivato preferenzialmente dai polifosfati di diadenosina (diadenosina tetra-, penta- ed esofosfati indicati dalla sigla comune AP_xA). Tuttavia questo recettore non è stato ancora clonato e si nutrono dubbi sulla sua reale esistenza. Gli effetti indotti dai polifosfati di diadenosina potrebbero essere mediati da altri membri già noti della famiglia. Altre informazioni sulla distribuzione e gli effetti evocati dai recettori P2 sono riassunti nella tabella 39.2 e nei paragrafi successivi.

Ruoli biologici delle purine

In alcuni sistemi biologici, ATP e adenosina inducono effetti simili, in altri mostrano attività opposte. Questo antagonismo funzionale è particolarmente interessante, in quanto in molti casi adenosina deriva da ATP precedentemente rilasciato come tale dalle terminazioni nervose. ATP evoca quindi risposte rapide, transienti e generalmente associate a eventi eccitatori; a esse segue l'effetto modulatore, più lento e in genere inibitorio di adenosina. Adenosina regola così con un meccanismo di *feed-back* inibitorio sia le attività eccitatorie di ATP che

quelle dei neurotrasmettitori classici liberati insieme con ATP dai terminali nervosi. Ne deriva inoltre che più è elevato il grado di attivazione iniziale (e quindi maggiore è il rilascio di ATP), maggiore sarà il controllo inibitorio esercitato da adenosina (in quanto maggiore sarà la quantità di nucleoside formatasi da ATP).

Effetti sul sistema cardiovascolare

Nel cuore, ATP induce inotropismo positivo, additivo con quello prodotto dagli agonisti β -adrenergici e dovuto ad attivazione di recettori P2X e stimolazione della conduttanza al calcio. Molto meglio caratterizzate dal punto di vista delle applicazioni terapeutiche sono le attività inotropa e cronotropa negative esercitate da adenosina; il recettore coinvolto è il sottotipo A₁ che svolge un antagonismo funzionale degli effetti inotropi e cronotropi positivi delle catecolamine. A livello atriale, gli effetti di adenosina sono "diretti" e dovuti ad attivazione della conduttanza al K⁺; a livello ventricolare, gli effetti sono "indiretti" e dovuti ad attenuazione dell'ingresso di Ca²⁺ attraverso i canali "L" indotta dai recettori catecolaminergici β_1 . Attualmente queste attività sono sfruttate terapeuticamente nel controllo delle aritmie sopraventricolari (Adenocard® per uso endovenoso; Tabella 39.3).

Recentemente, è stato stabilito per adenosina un ruolo nel "pre-condizionamento ischemico del miocardio", fenomeno secondo il quale un periodo di ischemia breve (1 o 2 minuti) protegge il miocardio dai danni dovuti a un'ischemia successiva prolungata nel tempo. A questa attività contribuiscono sia recettori A₁ che A₃; a livello molecolare, il meccanismo di protezione cellulare coinvolge l'attivazione (e migrazione nella membrana) di proteinchinasi C, e la fosforilazione di un substrato cellulare che conferisce resistenza al danno ischemico. Il contributo del recettore A₃ sembra essere anche indiretto e legato a massiccia degranolazione delle cellule immunitarie residenti del cuore durante il periodo di ischemia breve, con conseguente marcata riduzione del rilascio di metaboliti citotossici durante la seconda fase di ischemia protratta nel tempo.

Dati recenti suggeriscono che attraverso il recettore A_{2A} adenosina svolga un importante ruolo anti-infiammatorio, riducendo la produzione di citochine quali TNF- α e IL-6, che si ritrovano a livelli elevati nel sangue di pazienti affetti da patologie cardiovascolari croniche, quali lo scompenso cardiaco. L'attivazione del recettore A_{2A} potrebbe quindi contribuire a ritardare l'evoluzione della patologia e fornire nuovi approcci al controllo farmacologico di questa malattia.

A livello vasale, sia ATP che adenosina sono potenti vasodilatatori. L'effetto di adenosina è diretto e mediato da recettori vascolari del sottotipo A₂ (sia A_{2A} che A_{2B}) stimolatori sulla produzione intracellulare di cAMP. L'effetto di ATP è invece indiretto, secondario alla produzione di NO a sua volta dovuta all'attivazione di recettori vasali P2Y_{1,2,4}. Come trattato in dettaglio nel CD (vedi CD: Approfondimento 39.1), le purine giocano un ruolo fon-

TABELLA 39.3 Nomi commerciali e principali indicazioni terapeutiche di alcune specialità medicinali in vendita in Italia contenenti principi attivi ad azione sul sistema purinergico

Principio attivo	Nome commerciale della specialità medicinale	Principali indicazioni terapeutiche
Adenosina	Adenoscan	Uso ospedaliero in tecniche diagnostiche
	Krenosin	Uso ospedaliero
	Viaspan	Soluzione per conservazione organi
Bamifillina	Bamifix	Asma bronchiale
Caffeina (in associazione con alcaloidi dell'ergot)	Cafergot, Virdex	Emicrania essenziale; cefalea muscolo-tensiva; cefalea vasomotoria
Caffeina (in associazione con FANS)	Difmetrè, Neocibalgina, Neonisidina, Neoptalidon, Raffreddoremed, Saridon, Viamal	Trattamento sintomatico di mal di testa, nevralgie, mal di denti, dolori mestruali, dolori articolari, stati febbrili e sindromi da raffreddamento
Clopidogrel	Plavix	Prevenzione di eventi di origine aterotrombotica in pazienti affetti da infarto del miocardio o ictus ischemico cerebrale
Dipiridamolo	Aggrenox (+ acido acetilsalilico); Corosan, Persantin	Prevenzione dell'ictus in pazienti con precedenti attacchi ischemici transitori (TIA) o ictus ischemico totale da trombosi (prevenzione secondaria)
Teofillina	Diffumal, Euphyllina, Respicur, Theo24, Theodur, Theolair	Asma bronchiale
Ticlopidina	Antigreg, Aplaket, Chiaro, Clox, Fluilast, Flupid, Klodin, Opteron, Ticlodone, generici (Ticlopidina Alter, Ticlopidina Dorom, Ticlopidina Hexal, Ticlopidina Jet, Ticlopidina Pliva, Ticlopidina Ratiopharm)	Prevenzione secondaria di eventi ischemici occlusivi cerebro- e cardiovascolari in pazienti a rischio trombotico; prevenzione della riocclusione di bypass aortocoronarici

damentale nel controllo del tono vascolare in condizioni di ischemia/ipossia.

A livello piastrinico, adenosina è un potente inibitore e ADP un potente attivatore dell'aggregazione. L'effetto di adenosina è mediato da recettori A_2 stimolatori sulla produzione di cAMP, mentre l'effetto di ADP è mediato dall'attivazione del recettore P_2Y_{12} . Queste azioni sono già sfruttate terapeuticamente con due classi di farmaci: dipiridamolo, che, inibendo la ricaptazione di adenosina ne potenzia le attività sui recettori A_2 vasali e piastrinici, con conseguente aumento della vasodilatazione locale e riduzione dell'aggregazione piastrinica; ticlopidina, clopidogrel e gli antitrombotici di nuova generazione come ticagrelor, che agiscono come inibitori selettivi di P_2Y_{12} , riducendo marcatamente l'aggregabilità piastrinica e la formazione di trombi (Tabella 39.3).

Effetti sul sistema nervoso centrale e periferico

Come più volte ricordato, le purine sono colocalizzate con altri neurotrasmettitori nel sistema nervoso centrale. Dopo il rilascio dalle presinapsi, ATP induce, in genere, risposte eccitatorie, rapide e transienti, mediate da recettori P_2X . Recettori P_2X , soprattutto del sottotipo P_2X_2/P_2X_3 , sono presenti sulle fibre sensitive periferiche, dove, quando attivati da ATP rilasciato dalle cellule circostanti in conseguenza di traumi o infiammazione, mediano risposte depolarizzanti che permettono la trasmissione dell'impulso dolorifico al midollo spinale. Le fibre sensitive che giungono al midollo spinale rilasciano

vari trasmettitori eccitatori quali glutammato, sostanza P e di nuovo ATP; quest'ultimo, attivando recettori P_2X_2/P_2X_3 presenti sui neuroni nocicettivi, contribuisce alla trasmissione centrale del dolore. Antagonisti selettivi di questi recettori sono attualmente in fase avanzata di sviluppo come nuovi analgesici attivi in varie forme di dolore neuropatico attualmente incurabili. Recettori P_2X sono anche presenti in molte aree cerebrali dove partecipano alla neurotrasmissione eccitatoria; nell'ippocampo, attraverso l'attivazione di questi recettori, ATP partecipa all'induzione dell'LTP, evento alla base della memoria. Adenosina è invece uno dei più potenti inibitori conosciuti della trasmissione eccitatoria e dell'esocitosi presinaptica (in particolare, di catecolamine, acetilcolina e amminoacidi eccitatori). È proprio a queste attività che sono dovute le proprietà sedativo-ipnotiche, anticonvulsivanti, neuroprotettive e anti-ansia di adenosina. Questi effetti sono mediati da recettori A_1 sia pre- che postsinaptici presenti ubiquitariamente nel cervello e particolarmente abbondanti in ippocampo e corteccia cerebrale. È interessante notare che durante l'attacco epilettico, a causa delle ripetute scariche depolarizzanti, vengono liberate grandi quantità di purine: questo porta a formazione di adenosina che, inibendo il rilascio dei neurotrasmettitori, riduce la diffusione della scarica epilettica. Si sta ora cercando di sfruttare questo meccanismo endogeno di protezione per la riduzione del danno neurodegenerativo conseguente gli attacchi epilettici; lo sviluppo di tali farmaci è stato finora ostacolato dalla difficoltà di "separare" l'effetto desiderato di attivazione dei recettori A_1 cerebrali dagli effetti mediati dai recettori A_1 e A_{2A} sul sistema cardiovascolare. È

proprio all'antagonismo dei recettori A_1 inibitori centrali che si devono le proprietà eccitanti (aumento dell'attenzione, della concentrazione, dell'apprendimento e, più in generale, della "performance") di metilxantine (caffaina, teofillina e teobromina) presenti in bevande (caffè, tè, cola) o alimenti (cioccolato) ampiamente diffusi fra la popolazione mondiale.

Il recettore A_{2A} è invece presente quasi esclusivamente nei gangli della base, dove è colocalizzato con il recettore dopaminergico D_2 sugli interneuroni striatali contenenti GABA ed encefaline. Questi neuroni rappresentano una stazione importante del sistema extrapiramidale e su di essi i recettori A_{2A} e D_2 mediano effetti opposti. In particolare, adenosina inibisce e dopamina stimola l'attività locomotoria. Nel morbo di Parkinson vi è una degenerazione progressiva dei neuroni dopaminergici, che si manifesta con bradicinesia e tremori; in questi soggetti, gli antagonisti del recettore A_{2A} alleviano in maniera significativa la sintomatologia, riducendo l'inibizione esercitata da adenosina sull'attività motoria. Su queste basi, sono al momento in fase avanzata di sviluppo antagonisti A_{2A} -selettivi come nuovi agenti terapeutici utili in questa malattia (vedi CD: Approfondimento 39.2). Gli effetti mediati dal recettore A_{2A} nel sistema extrapiramidale rappresentano anche la base molecolare della stimolazione dell'attività motoria indotta dalle metilxantine. Questo ruolo del recettore A_{2A} è stato confermato da studi condotti su topi knockout, i quali oltre a presentare un aumento spontaneo della pressione sanguigna (in accordo con l'attività vasodilatatoria mediata dal recettore A_{2A}), non mostrano più stimolazione dell'attività motoria dopo somministrazione di caffeina. Questi animali mostrano anche elevata aggressività e ipoalgesia, suggerendo un ruolo del recettore A_{2A} anche nel controllo del comportamento e nella mediazione dei segnali nocicettivi. In apparente contrasto con l'attività anti-infiammatoria mediata dal recettore A_{2A} sulle cellule circolanti e diversamente dall'attività neuroprotettiva mediata dal recettore A_1 , l'attivazione eccessiva dei recettori A_{2A} cerebrali, soprattutto di quelli presenti sulle cellule microgliali, sembra indurre morte cellulare e contribuire alla neurodegenerazione. Recenti ipotesi sperimentali ne suggeriscono infatti un ruolo nel danno neurodegenerativo associato a ischemia e in altre patologie neurodegenerative croniche dei gangli della base, quali la corea di Huntington.

Benché nel cervello sia espresso a livelli molto bassi, il recettore A_3 è stato implicato nella regolazione della sopravvivenza cellulare. A seconda delle condizioni fisiopatologiche, l'attivazione di questo recettore su neuroni e cellule astrogliali induce sia effetti trofici e differenziativi (e conseguente "protezione cellulare") che necrosi e/o apoptosi, con possibili implicazioni nel danno neurodegenerativo sia acuto (ad esempio, ischemia) che cronico (malattie associate all'invecchiamento). In particolare, la citoprotezione mediata da questo recettore, che presenta interessanti analogie con la protezione del miocardio discussa in precedenza, potrebbe in futuro essere sfruttata terapeuticamente per incrementare la "resistenza" del

cervello al danno neurodegenerativo durante trauma od ischemia. Ancora controverso è il ruolo di ATP nella modulazione del danno neurodegenerativo conseguente a ischemia/ipossia.

Effetti sul sistema respiratorio

Nei pazienti asmatici e rinitici, adenosina induce bronco-costrizione per lo più dovuta ad attivazione di recettori localizzati su cellule mediatrici dell'infiammazione o sulle terminazioni nervose afferenti. Attraverso l'attivazione dei sottotipi A_{2B} e A_3 , adenosina potenzia il rilascio di istamina e di mediatori pro-infiammatori e pro-contratturanti da mastociti e basofili; antagonisti A_{2B} - e A_3 -selettivi potrebbero quindi rivelarsi utili nel prevenire (o ridurre) l'effetto bronco-costrittore di adenosina endogena. Questa ipotesi è anche confermata dalla dimostrazione che il derivato xantinico enprofyllina, antiasmatico già impiegato in terapia, è un antagonista selettivo (benché poco potente) del recettore A_{2B} e potrebbe quindi rappresentare la molecola di partenza per la sintesi di nuovi e più potenti farmaci antiasmatici. Adenosina inibisce anche la liberazione di acetilcolina dalle terminazioni nervose vagali; la somministrazione per aerosol di un oligonucleotide antisense per il recettore A_1 in un modello animale di asma allergica attenua notevolmente la bronco-costrittore indotta da una successiva esposizione ad adenosina o ad allergeni, suggerendo un ruolo specifico per i recettori A_1 in questa patologia e aprendo la strada a possibili terapie antisense nell'asma e patologie correlate.

Gli effetti indotti da adenosina a livello bronchiale sono antagonizzati da metilxantine quali teofillina, per lungo tempo utilizzata nella terapia dell'asma (Tabella 39.3); tuttavia non è ancora chiaro se l'effetto antiasmatico di queste molecole sia del tutto ascrivibile a competizione recettoriale con adenosina o piuttosto a inibizione delle fosfodiesterasi bronchiali con conseguente aumento dei livelli intracellulari di cAMP.

Come sopra descritto, i derivati nucleotidici (UTP in particolare) hanno effetti importanti sulla secrezione di sali e fluidi negli epitelii delle vie respiratorie attraverso l'attivazione dei recettori $P2Y_2$. La somministrazione per aerosol di questi derivati può normalizzare le secrezioni epiteliali nei pazienti con fibrosi cistica, aprendo nuove prospettive terapeutiche alla cura di questa grave malattia.

Effetti su altri sistemi

Recettori $P1$ e $P2$ sono stati identificati praticamente in tutti gli organi e sistemi, anche se in alcuni casi il loro ruolo funzionale non è ancora del tutto chiaro (Tabelle 39.1 e 39.2).

Sulla muscolatura liscia della vescica, adenosina è un potente rilasciante attraverso l'attivazione di recettori A_2 , mentre ATP induce una risposta contratturante rapida e transiente; questa attività bifasica delle purine ha permesso di ipotizzarne un ruolo nel meccanismo di

svuotamento della vescica, con possibili sviluppi futuri nel trattamento dell'incontinenza urinaria.

Nel sistema gastrointestinale, ATP regola la secrezione di acido cloridrico dalle cellule epiteliali gastriche ed esercita un'azione inibitoria sulla motilità intestinale; inoltre, insieme ad adenosina, stimola la glicogenolisi epatica e la secrezione pancreatica di insulina e di glucagone.

Infine, gli adipociti posseggono recettori A_1 e A_2 modulatori sulla lipolisi e sull'ossidazione del glucosio; purinocettori sono espressi anche da spermatozoi, cellule amniotiche, cellule cromaffini, e cellule acinari della parotide. Ciò suggerisce che le purine possano essere coinvolte, oltre che nelle funzioni sopra descritte, anche nella regolazione endocrina ed esocrina, e nella riproduzione.

Effetti non recettoriali

La mancata espressione di ADA, enzima deputato al catabolismo di adenosina, caratterizza la "sindrome da deficienza di ADA", malattia genetica nella quale si verifica un massiccio accumulo intracellulare di adenosina e desossadenosina, soprattutto a livello delle cellule immunitarie. Le elevate concentrazioni di nucleoside provocano gravi alterazioni dell'equilibrio energetico cellulare e attivano vie metaboliche di morte, con conseguente apoptosi dei linfociti e comparsa di immunodeficienza grave che risulta letale per il paziente entro pochi anni di vita. Grazie alla messa a punto di un efficace approccio di terapia genica da parte di un gruppo di ricerca italiano, questa patologia può essere ora completamente curata, restituendo una vita normale ai piccoli pazienti che erano altrimenti costretti a vivere completamente isolati dal mondo per evitare di contrarre infezioni letali. Lo studio di questa patologia ha inoltre permesso di evidenziare gli effetti non-recettoriali esercitati da adenosina sulla sopravvivenza cellulare e ha condotto all'idea di sintetizzare analoghi purinici che, attraverso l'induzione di apoptosi, possano essere utilizzati nella terapia antitumorale a seguito dell'accumulo nel citoplasma cellulare. Anche se non mediate da recettori di membrana, queste azioni sono comunque ritenute altamente specifiche, in quanto prevedono il coinvolgimento di vie intracellulari ben definite. È proprio attraverso queste vie biochimiche che adenosina svolge un ruolo importante nello sviluppo embrionale, contribuendo al rimodellamento tissutale, all'eliminazione di strutture di utilità solo temporanea (ad esempio, le membrane interdigitali), e all'assetto definitivo del sistema immunitario attraverso il riconoscimento (e l'eliminazione mediante apoptosi) dei potenziali cloni autoreattivi. Studi in vitro hanno

inoltre evidenziato che adenosina esercita effetti citotossici anche su cellule precursori delle fibre muscolari, suggerendo che alterazioni di questo sistema possano svolgere un ruolo nella patogenesi di alcune forme di distrofia muscolare. Si è quindi consolidata in questi ultimi anni la consapevolezza che la caratterizzazione dei meccanismi alla base degli effetti intracellulari esercitati da adenosina possa ampliare le nostre conoscenze della patogenesi delle malattie umane e offrire spunti per lo sviluppo di nuovi farmaci.

Le purine nella terapia antitumorale

Varie molecole utilizzate come antitumorali sono in realtà derivati purinici o pirimidinici modificati chimicamente allo scopo di sostituirsi alle molecole naturali durante la sintesi degli acidi nucleici, provocando danni incompatibili con la sopravvivenza cellulare (vedi Capitolo 28). In realtà, studi recenti hanno evidenziato come queste molecole siano anche in grado di attivare vie intracellulari di morte, quali le vie caspasiche, permettendo di definire meccanismi d'azione più specifici per queste molecole e consentendo una migliore comprensione dei loro effetti terapeutici.

Un'ulteriore speranza per la terapia dei tumori deriva da studi effettuati con agonisti per il recettore A_3 ; queste molecole sono in grado di indurre effetti tossici sulle cellule tumorali accompagnati da stimolazione concomitante della proliferazione delle cellule immunitarie, aumentando così le difese naturali dell'ospite. Alcune di queste molecole sono in fase avanzata di sperimentazione clinica in Israele, anche se ancora non è chiaro se l'effetto sia dovuto esclusivamente a stimolazione del recettore A_3 o anche a meccanismi non-recettoriali. Oltre che in varie forme di carcinoma, queste molecole sono anche in fase clinica avanzata come nuovi antinfiammatori in alcune malattie autoimmuni, quali l'artrite reumatoide o la psoriasi. Il razionale per il loro uso si basa sulla capacità di questi derivati di indurre morte dei cloni immunitari autoreattivi responsabili dello sviluppo della malattia.

Studi condotti anni fa avevano suggerito un potenziale utilizzo di ATP nella terapia antitumorale, attraverso l'attivazione del recettore P2X7 citotossico, ma a questa osservazione non hanno fatto seguito valutazioni cliniche mirate. Sono state invece confermate le attività anticancerogene di ATP, somministrato per via endovenosa, nei pazienti con tumori sottoposti a chemioterapia, con notevole miglioramento della qualità della vita.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Nucleotidi e nucleosidi purinici e pirimidinici svolgono funzioni altamente specifiche nella neurotrasmissione, nella comunicazione fra vari tipi cellulari nel sistema nervoso, cardiovascolare, respiratorio e immunitario attraverso l'attivazione dei recettori P1 e P2.
- ▶ Difetti e disregolazioni della trasmissione purinergica sono alla base di malattie umane molto gravi, quali l'ischemia cerebrale, i tumori e patologie immunitarie.
- ▶ Il sistema purinergico e i suoi recettori stanno emergendo come nuovi interessanti bersagli farmacologici per la diagnosi o la cura di queste e di altre malattie.
- ▶ Alcuni farmaci che bersagliano il sistema purinergico sono già impiegati in terapia come antitrombotici e antitumorali; altri sono attualmente in fase avanzata di sviluppo per il morbo di Parkinson, il dolore neuropatico, la fibrosi cistica, la sindrome dell'occhio secco e patologie infiammatorie/tumorali.

Bibliografia essenziale

- ▶ Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* 2006;58(3):281-341.
- ▶ Burnstock G. Purinergic receptors and pain. *Curr Pharm Des* 2009;15(15):1717-35.
- ▶ Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(7):575-90.
- ▶ Surprenant A, North RA. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* 2009;71:333-59.
- ▶ Wilson CN, Mustafa SJ. Adenosine receptors in health and disease. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 193. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.

I neuropeptidi

Lucia Negri, Roberta Lattanzi

Obiettivi formativi

- ▶ Analizzare i meccanismi di sintesi e liberazione di peptidi e proteine di secrezione
- ▶ Descrivere le caratteristiche della trasmissione neuropeptidergica, sottolineando le analogie e le differenze rispetto ai neurotrasmettitori convenzionali
- ▶ Esempificare alcune delle principali funzioni regolate dai neuropeptidi

I peptidi, sequenze lineari di amminoacidi uniti fra loro da legame peptidico, sono presenti in tutto il regno animale a partire dai celenterati (peptidi della famiglia FMR-amide), ma si trovano anche nelle piante. I peptidi originano da geni primordiali, vecchi di milioni di anni che, in seguito a duplicazione e mutazione puntiforme, si sono modificati nel tempo fino a dare origine a quelli che oggi codificano le diverse famiglie di peptidi.

La prima dimostrazione della presenza di un principio attivo di origine proteica (perché veniva distrutto da enzimi proteolitici) in tessuti di mammifero risale al 1931, quando von Euler e Gaddum caratterizzarono mediante saggio biologico la sostanza P (sostanza proteica, SP) nel cervello e nell'intestino di cavallo. Ma a quel tempo la determinazione della struttura chimica di un peptide era una impresa impossibile. La sequenza amminoacidica della sostanza P fu chiarita solo 40 anni dopo da Chang e Leeman che manipolarono quintali di ipotalamo di bue per riuscire a estrarla. Nel frattempo Vittorio Erspamer (vedi **CD**: Approfondimento 2.5 e Approfondimento 40.1. *Caratteristiche di alcuni neuropeptidi*), in Italia, aveva già isolato da invertebrati marini e da anfibi altri peptidi con proprietà biologiche simili alla sostanza P, come *eledoisina*, *fisalemina* e *kassinina*. Ne aveva identificato la sequenza amminoacidica e li aveva classificati in una unica famiglia a cui aveva dato il nome di *tachichinine*. Quando fu scoperta, la struttura della SP risultò molto simile a quelle già conosciute delle tachichinine, come era da aspettarsi in base alle analogie nelle proprietà biologiche. All'intera famiglia di questi peptidi fu conservato il nome di tachichinine. Dalla pelle delle rane Erspamer isolò in seguito molti altri peptidi, analoghi di peptidi successivamente isolati da cervello e intestino di mammiferi. Così

la *ceruleina* è risultata essere la controparte anfibia della colecistochinina. La struttura della *sauvagina* contribuì alla identificazione della sequenza amminoacidica del corrispondente analogo mammifero, l'ormone rilasciante la corticotropina (CRF). La *bombesina* ha permesso di identificare l'ormone rilasciante la gastrina (GRH).

Già nel 1950 l'ormone ipotalamico ossitocina era stato chimicamente identificato come un nonapeptide (nel 1953 du Vigneaud vinse il premio Nobel per aver sequenziato e messo a punto la sintesi della ossitocina) e dalla fine degli anni 50 Victor Mutt identificò nuovi ormoni peptidici nel tratto gastrointestinale e successivamente ne dimostrò la presenza anche nel cervello. Nel 1975 Hughes e Kosterlitz isolarono dal cervello due pentapeptidi capaci di riprodurre molti degli effetti farmacologici della morfina: le *enkefaline*.

La presenza di peptidi nel tessuto nervoso e lo sviluppo della immunoistochimica dimostrarono che i neuroni possono sintetizzare e rilasciare peptidi.

Caratteristiche dei neuropeptidi

I classici neuropeptidi sono piccole molecole proteiche (3-100 amminoacidi) che regolano diverse funzioni del sistema nervoso centrale

Essi sono prodotti da neuroni sia centrali che periferici, rilasciati secondo una modalità di secrezione controllata, con capacità di modulare o mediare funzioni neurali agendo su recettori neurali, solitamente del tipo a sette domini transmembrana associati a G-proteine (GPCR). Sono stati trovati più di 70 geni che codificano per que-

sto tipo di neuropeptidi e si conoscono oggi più di 100 trasmettitori neuropeptidici che regolano diverse funzioni del sistema nervoso centrale come sonno/veglia, emotività, appetito e bilancio energetico, dolore e analgesia, apprendimento e memoria.

Altri peptidi secreti dalle cellule (che è in discussione se annoverare tra i neuropeptidi) modulano funzioni del sistema nervoso. Possono essere prodotti non solo dai neuroni ma anche dalle cellule della glia (soprattutto microglia) come le chemochine del sistema immunitario e i fattori di crescita. Infatti sono sempre più numerose le dimostrazioni della presenza di chemochine e dei loro recettori nei neuroni e degli effetti elettrofisiologici delle chemochine sui neuroni; le chemochine sono anche implicate nella migrazione neurale e nella neuroinfiammazione. Alcuni fattori di crescita della famiglia delle neurotrofine, come ad esempio il BDNF, hanno le caratteristiche dei neuropeptidi. Il gene del BDNF è ampiamente espresso nei neuroni, e il precursore del BDNF contiene il peptide segnale e siti di taglio per le convertasi. Il BDNF è presente in vescicole secretorie dense ed è soggetto a liberazione stimolata, soddisfacendo, così, le caratteristiche dei neuropeptidi.

Esistono inoltre ormoni peptidici di origine periferica non neuronale, come la leptina e l'insulina, che pur tuttavia inviano segnali al cervello.

Dalla metà degli anni 70 in poi una molteplicità di nuovi peptidi è stata identificata grazie a nuovi approcci sperimentali soprattutto basati su tecniche di biologia molecolare. Il sequenziamento del genoma umano, l'individuazione di trascritti codificanti per peptidi potenzialmente attivi, la costruzione di librerie di cDNA hanno permesso di individuare recettori orfani, ma anche peptidi orfani di cui può essere successivamente delucidata la/e funzione/i.

Trasmissione peptidica

La trasmissione peptidica presenta sia analogie che differenze con la trasmissione operata dai neurotrasmettitori "convenzionali", quelli non-peptidici, come ammine e amminoacidi. L'accumulo intravescicolare e la liberazione calcio-dipendente dei peptidi sono aspetti comuni alle altre neurotrasmissioni. Gli effetti dei peptidi sulle cellule bersaglio coinvolgono meccanismi recettoriali specifici. Possono essere eccitatori o inibitori, pre- o postsinaptici, ed essere esercitati su aree vicine o distanti rispetto al sito di liberazione. Le principali differenze risiedono nella biosintesi peptidica, nell'interazione recettoriale e nell'estinzione del segnale (vedi anche Capitolo 32).

Sintesi dei neuropeptidi

Diversamente dai neurotrasmettitori "convenzionali", la sintesi dei neuropeptidi richiede la trascrizione in toto del DNA genomico per formare hnRNA (RNA eterologo nucleare). Questo RNA, rimossi gli introni e alcuni esoni, viene ricongiunto (*splicing*) per formare la sequenza

definitiva dell'mRNA che sarà tradotta (traslata) dalla macchina ribosomiale nella molecola proteica. Il controllo del processo di *splicing*, così come le successive modificazioni post-traslazionali, permettono di ottenere da un singolo gene precursore neuropeptidi diversi, in maniera tessuto-specifica (Figura 40.1).

Ad esempio la calcitonina e il CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*) sono prodotti da *splicing alternativo*, tessuto specifico, di un singolo trascritto primario. Ne derivano due peptidi con attività biologica molto diversa: la calcitonina, prodotta dalle cellule "C" parafollicolari della tiroide, che controlla il metabolismo del calcio e del fosforo, e il CGRP, prodotto dai neuroni, che ha diversi ruoli tra cui l'abbassamento della soglia di attivazione dei nocicettori ed è anche un potente vasodilatatore. Per questo i suoi recettori sono potenziali target per il trattamento dell'emigrania. Le tachichinine, i cui membri conservano la stessa sequenza C-terminale, sono codificate, nella

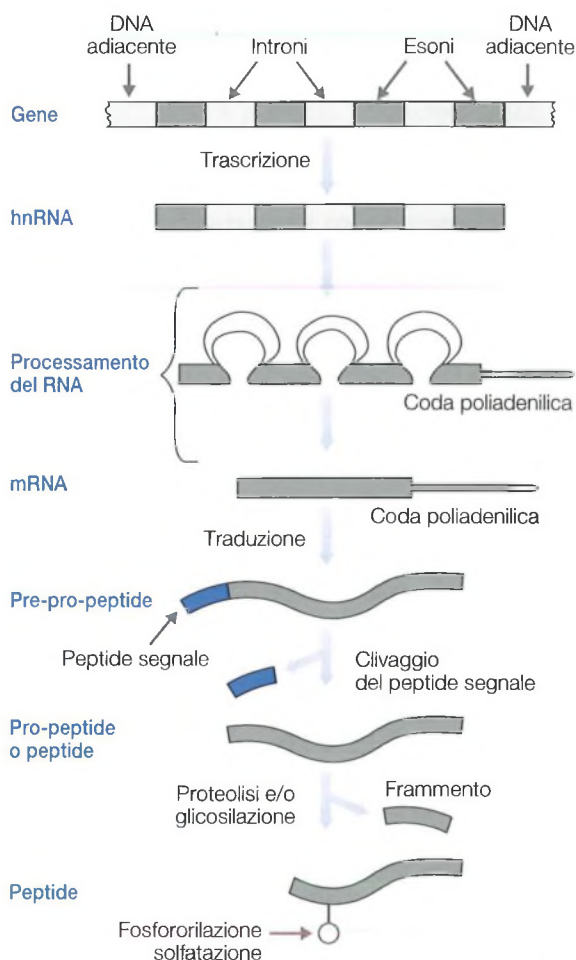


FIGURA 40.1 Tappe dell'espressione di un gene codificante per un neuropeptide: l'intera sequenza di DNA viene trascritta in hnRNA che, dopo l'eliminazione degli introni e l'aggiunta di una coda poliadenilica, dà origine a mRNA che viene tradotto in pre-peptide. Questo, dopo la rimozione della "sequenza segnale" e mediante reazioni di idrolisi e/o glicosilazioni e/o fosforilazioni o solfatazioni, viene trasformato in peptide maturo.

specie umana, da due geni pre-protachichinine (PPT) A e B. Splicing alternativo di PPT-A dà luogo a due diversi mRNA: uno di questi contiene la codifica per SP e neurokinina A, l'altro per la sola SP. Il rapporto quantitativo tra i due mRNA varia ampiamente da tessuto a tessuto e nelle diverse aree del sistema nervoso. PPT-B dà origine alla neurochinina B (vedi **CD**: Approfondimento 40.1).

Dopo lo splicing, l'mRNA maturo viene esportato nel citoplasma per la traslazione. La proteina iniziale traslata sul ribosoma è un molecola inattiva, un precursore (pre-pro-peptide) che deve essere ulteriormente processato. Il pre-pro-peptide contiene, in corrispondenza dell'N-terminale, una sequenza segnale di 20-25 amminoacidi, fortemente idrofobica, necessaria per l'inserimento del prodotto genico di nuova sintesi nel lume del reticolo endoplasmico rugoso (RER). La sequenza segnale viene staccata dal peptide nascente durante l'attraversamento della membrana del reticolo endoplasmico (*cotranslational processing*) da apposite endopeptidasi (*signal-peptidase*), liberando così il pro-neuropeptide nel complesso del Golgi, dove sarà impaccato in granuli di secrezione di grosso diametro (100-300 nm) con contenuto elettrondenso (LDCV, *Large Dense-Core Vesicle*).

Durante il trasporto il pro-neuropeptide subisce nelle vescicole secretorie altre modificazioni post-traslazionali: ad esempio, ulteriori tagli e modifiche delle catene laterali.

Trasformazione del pro-peptide

Spesso peptidi diversi tra loro sono presenti nel medesimo precursore, come accade per i peptidi oppioidi. Talvolta il precursore contiene unicamente copie multiple dello stesso peptide, come il precursore del TRH che contiene 5 copie del tripeptide TRH. Il peptide attivo solitamente è delimitato all'interno della sequenza del pro-ormone da coppie di amminoacidi basici (*basic motifs*, Lys-Arg o Lys-Lys, Arg-Arg o Arg-Lys), che sono siti di riconoscimento per le *convertasi del pro-ormone*, una piccola famiglia di endo-proteasi cellulose-specifiche (di cui sono stati studiati in dettaglio due sottotipi, *prohormone convertases 1 e 2*, PC1 e PC2) che tagliano il pro-peptide in posizioni diverse generando così peptidi diversi a partire da uno stesso precursore.

Ad esempio, ACTH e β -lipotropina sono gli ormoni principali derivati da POMC in periferia, mentre α -MSH e β -endorfine sono i principali neuropeptidi POMC-derivati nel cervello. Ciò dipende dal diverso processamento che avviene nell'ipofisi anteriore o nei neuroni ipotalamici. Oppure si possono generare peptidi di lunghezza variabile a partire dalla stessa sequenza primaria: ad esempio, la pro-colecistochinina (pro-CCK) contiene la sequenza di almeno 5 peptidi simili a CCK, che variano in lunghezza da 4 a 58 amminoacidi. Il CCK stesso (33 amminoacidi) è il principale peptide prodotto dall'intestino, mentre il cervello produce principalmente CCK-8 (vedi **CD**: Approfondimento 40.1).

All'interno della sequenza del pro-peptide, tra i frammenti dei peptidi attivi vi sono anche lunghe sequenze delle quali non si conosce la funzione. L'osservazione della

distribuzione di putativi siti di taglio nella molecola del pro-peptide ha a volte permesso di scoprire peptidi prima sconosciuti, come è successo per il CGRP. Tuttavia sono molte sequenze peptidiche a cui non è stata assegnata ancora nessuna funzione.

I peptidi generati dalle pro-ormone-convertasi possono essere oggetto di ulteriori modifiche: l'*amidazione C-terminale* a opera di peptidil-amminotransferasi (PAM), che utilizza una glicina C-terminale come donatore di ammidate per l'amminoacido precedente, è una modifica a cui vanno soggetti molti neuropeptidi ed è spesso essenziale per l'attività biologica. Altre possibili modifiche sono: glicosilazione, acetilazione, solfatazione o fosforilazione delle catene amminoacidiche collaterali. Ad esempio, l'acetilazione in posizione N-terminale aumenta significativamente la attività biologica di α -MSH, mentre riduce quella di β -endorfina.

Alcune endopeptidasi sono target di farmaci, come ad esempio gli inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina: captopril, enalapril, lisinopril, ampiamente usati nel trattamento dell'ipertensione.

I neuropeptidi sono concentrati in grosse vescicole e il loro rilascio è calcio-dipendente

A differenza dei "neurotrasmettitori veloci", come gli amminoacidi eccitatori e le catecolamine, che, nei neuroni centrali, vengono immagazzinati in piccole vescicole sinaptiche chiare (SSV, *Small clear Synaptic Vesicles*) assemblate in corrispondenza dei terminali sinaptici, i neuropeptidi vengono immagazzinati in LDCV, assemblate nell'apparato del Golgi e trasportate nel corpo cellulare: si possono trovare a ridosso della membrana plasmatica o concentrate in varicosità assionali o sparse nel citoplasma non solo nel terminale presinaptico ma anche nel soma e nei dendriti delle cellule nervose. Quando arriva il segnale bioelettrico, i granuli secretori in prossimità della membrana plasmatica si fondono con essa e versano all'esterno il loro contenuto peptidico (*secrezione regolata*, cioè controllata da un segnale bioelettrico) anche al di fuori dello spazio sinaptico. Questo fenomeno è Ca^{2+} -dipendente come avviene per le SSV dei neurotrasmettitori classici (Figura 40.2).

Per attivare il rilascio del neuropeptide occorre alta frequenza di stimolazione del neurone. Infatti, mentre un singolo potenziale di azione può essere sufficiente a indurre la fusione di SSV con la membrana plasmatica, è richiesto un rapido treno di potenziali per indurre la liberazione dei neuropeptidi dalle LDCV. Così diversi modelli di attività elettrica del neurone possono portare a liberazione preferenziale di un neuropeptide o di un piccolo neurotrasmettitore o di entrambi. Poiché i neuropeptidi tendono a essere liberati sotto condizioni di sostenuta attività, essi possono modulare positivamente o negativamente le sinapsi fortemente stimolate.

La presenza di un sensore per il Ca, CAPS (*Calcium-dependent Activator Protein for Secretion*) associato specificamente alle LDCV, le rende sensibili ai piccoli aumenti della concentrazione del Ca^{2+} nell'ambiente

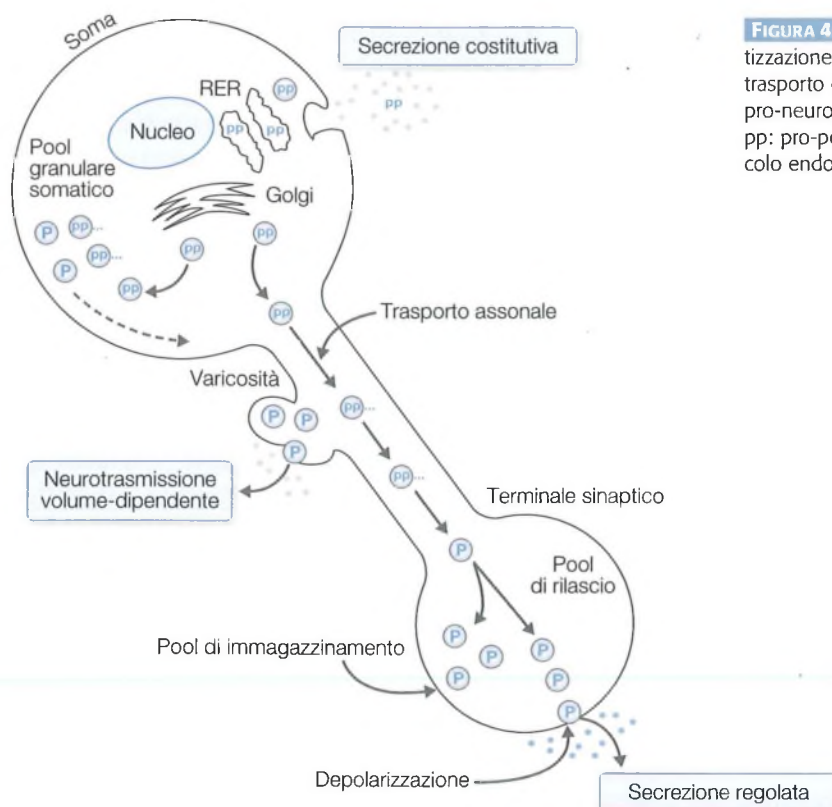


FIGURA 40.2 Neurone peptidergico: schematizzazione del processo di sintesi, accumulo, trasporto e rilascio di un neuropeptide e di un pro-neuropeptide.
pp: pro-peptide; P: peptide maturo; RER: reticolo endoplasmatico rugoso

citoplasmatico lontano dalla sinapsi, permettendo quindi la esocitosi extrasinaptica. Una piccola parte del pro-peptide può essere liberata con il meccanismo della *secrezione costitutiva* che non prevede la concentrazione dei peptidi in granuli secretori, né il loro rimodellamento molecolare con processi proteolitici, né siti preferenziali di esocitosi. Questo tipo di secrezione avviene generalmente a livello del corpo cellulare. La grossa molecola del precursore così secreta non funziona come neurotrasmettitore, ma in alcuni casi svolge funzioni di fattore di crescita (Figura 40.2). È particolarmente evidente durante lo sviluppo embriogenetico in alcune popolazioni neuronali e probabilmente svolge un importante ruolo nell'organizzazione e nello sviluppo della rete neuronale.

È comune la coesistenza nello stesso neurone di LDCV,

contenenti anche più di un peptide e SSV, contenenti i trasmettitori veloci, che possono essere rilasciati contemporaneamente (*co-trasmisione*) (Tabella 40.1). Un esempio è dato dal co-rilascio di CGRP e SP (in rapporto stechiometrico di 1:1) che avviene a livello delle terminazioni centrali e periferiche dei DRG. Ci sono esempi di neuroni contenenti più peptidi, come ad esempio alcuni neuroni del nucleo sopraottico dell'ipotalamo, che contengono ossitocina, enkefaline, colecistochinina e CART (*Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript*).

Il corredo di neurotrasmettitori dei neuroni dell'SNC – costituito da uno o più neuropeptidi con uno o più neurotrasmettitori classici che possono essere coliberati – è altamente plastico, come dimostrato dalle differenze osservabili durante lo sviluppo e più tardi nella vita adulta così come in corso di malattia.

TABELLA 40.1 Esempi di colocalizzazione nella stessa terminazione nervosa

Neuropeptidi	Trasmettitori classici	Siti di colocalizzazione
Neuropeptide Y (NPY)	Noradrenalina	Neuroni del locus coeruleus; neuroni pregangliari simpatici
VIP	Acetilcolina	Neuroni pregangliari parasimpatici
CGRP	Acetilcolina	Neuroni spinali motori
Neurotensina, colecistochinina	Dopamina	Neuroni della substantia nigra
TRH, sostanza P, encefalina	5-HT	Neuroni dei nuclei del rafe
Encefalina	GABA	Neuroni striatali che proiettano nel globus pallidus
Dinorfina, sostanza P	GABA	Neuroni striatali che proiettano nella pars reticulata della substantia nigra

Come si accende e si spegne il segnale peptidergico

Una volta rilasciati, in genere al di fuori dello spazio sinaptico (*rilascio parasinaptico*), i peptidi possono raggiungere recettori posti anche a notevole distanza dal sito di rilascio. Si tratta di una forma di trasmissione endocrina a cui è stato dato il nome di neurotrasmissione volume-dipendente (VNT, *Volume NeuroTransmission*) o *neurotrasmissione extrasinaptica*.

I recettori per i neuropeptidi, salvo rare eccezioni, ad esempio l'insulina, appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati a G-proteine, che rispondono allo stimolo più lentamente dei recettori-canale. Inoltre molte delle azioni mediate da G-proteine e secondi messaggeri modulano la capacità di risposta del neurone.

È importante sottolineare che i neuropeptidi hanno un peso molecolare circa 50 volte maggiore dei "classici" neurotrasmettitori; possiedono, quindi, più siti di riconoscimento per i recettori e, di conseguenza, mostrano una maggiore affinità (nM versus mM) e selettività di legame per i propri recettori rispetto ai neurotrasmettitori classici. Quasi sempre a un neuropeptide corrispondono più sottotipi recettoriali, diversamente distribuiti nel sistema nervoso, ai quali si lega con affinità diverse. Spesso peptidi correlati possono condividere i loro recettori, come ad esempio accade per i peptidi della famiglia del CRF: il recettore CRF₁ ha alta affinità sia per il CRF che per il peptide correlato urocortina, mentre il recettore CRF₂ lega preferenzialmente la urocortina.

ACTH, α -MSH e γ -MSH, peptidi derivati da POMC, si legano e attivano con diversa potenza tutti i membri della famiglia dei recettori per le melanocortine MC₁₋₅. MC₄ può legare anche un peptide diverso, ARP (*Agouti-Related Peptide*), che funge da antagonista. MC₄ è infatti il primo recettore di cui è stato individuato un antagonista endogeno, oltre agli agonisti endogeni. I ligandi di MC₄ intervengono nella regolazione del comportamento alimentare.

I recettori dei neuropeptidi (ma succede anche per recettori a G-proteine di alcuni piccoli neurotrasmettitori, ad esempio la dopamina), oltre che nello spazio sinaptico, si trovano anche sulla membrana plasmatica dell'assone, del corpo cellulare e dei dendriti.

Una volta tradotto il segnale, i neuropeptidi vengono degradati da endo- ed eso-peptidasi (diverse da quelle coinvolte nella sintesi) che si trovano sulle membrane extracellulari; la loro concentrazione e attività sono tali che i peptidi possono diffondere nel sistema nervoso a distanza relativamente grande. L'emivita di un neuropeptide nello spazio extracellulare è lunga. Ad esempio, l'emivita dell'ossitocina e della vasopressina è circa 20 minuti nel cervello a fronte di soli 2 minuti nel sangue. I neuropeptidi non vengono ricaptati dai terminali sinaptici, come invece avviene per le ammine biogene. A questa regola fa eccezione la colecistochinina per la quale è stato descritto uno specifico trasportatore di membrana ad alta affinità. Quindi, al contrario dei neurotrasmettitori classici che possono essere riutilizzati grazie al

meccanismo della ricaptazione, i neuropeptidi devono essere risintetizzati e trasportati per via assonale verso le terminazioni nervose (vedi anche Capitolo 32).

I recettori dei neuropeptidi vengono internalizzati dopo l'attivazione e successivamente reinserti in membrana o degradati. Ad esempio, il recettore della neurochinina-1 è internalizzato 5 minuti dopo l'attivazione da parte dell'agonista e viene poi reinserto in membrana in 30 minuti. In alcuni casi, come per la neurotensina, il recettore internalizzato viene trasportato dalla sinapsi fino al corpo cellulare. È stata dimostrata la presenza di complessi neuropeptide-recettore vicino al nucleo della cellula.

La co-localizzazione nello stesso neurone di neuropeptidi e neurotrasmettitori classici che possono essere co-liberati (*cotrasmissione*) consente comunicazione sinaptica rapida (2-5 ms) e lenta (100-500 ms) (vedi Capitolo 32).

Significato funzionale e potenzialità terapeutiche

Oltre a svolgere il ruolo di messaggeri, come i classici neurotrasmettitori, i neuropeptidi contribuiscono alla formazione di elementi strutturali durante lo sviluppo ontogenico dell'SNC e al mantenimento della plasticità neuronale nell'adulto. Alcuni peptidi altamente espressi durante lo sviluppo perinatale vengono down-regolati dopo la nascita, ma possono ricomparire anche in età adulta in particolari momenti funzionali o patologici (ad esempio: VIP, NPY, PK2 nei neuroni sensoriali in seguito a lesione di un nervo; somatostatina nei neuroni centrali negli accumuli di β -amiloide; galanina nei neuroni sensoriali, CGRP nei motoneuroni). Il livello di espressione dei neuropeptidi varia considerevolmente in diverse condizioni ed è soggetto anche a variazioni circadiane e a manipolazioni sperimentali. I neuropeptidi esercitano la loro azione soprattutto quando il cervello si trova in condizione di stress o afflitto da patologie. Secondo Tomas Hökfelt ciò suggerisce che la comunicazione peptidergica rappresenti un linguaggio fisiologico che viene maggiormente utilizzato dal cervello danneggiato, aprendo la strada alla possibilità di intervenire sul sistema peptidergico per lo sviluppo di sempre nuovi farmaci (vedi **CD**: Approfondimento 40.2. *Ipotalamo e neuropeptidi* e Approfondimento 40.3. *Neuropeptidi e nocicezione*).

La mancanza di agonisti e antagonisti selettivi per i diversi sottotipi recettoriali è stato un grave handicap alla comprensione delle funzioni dei sistemi peptidergici. Indicazioni molto importanti per la comprensione del ruolo funzionale dei peptidi recentemente identificati vengono dalla costruzione di animali transgenici che presentano repressione o iperespressione di geni per peptidi o loro recettori.

La ricerca sui neuropeptidi, iniziata negli anni 60, ha generato e continua a fornire un elevato flusso di dati: sono stati individuati una dozzina di grandi famiglie di peptidi e un numero considerevole di piccole di cui si

TABELLA 40.2 Neuropeptidi raggruppati per famiglie e loro recettori

Peptide	Recettore	Antg.	Ag.	Indicazioni cliniche	
Oppioidi	Enkefaline	δ		Vedi Capitolo 41	
	Endorfine β	μ			
	Dinorfina A, dinorfina B	κ			
	Nocicettina (orphanin FQ)	NOP			
POMC derivati	Melanocortina				
	Melanocyte Stimulating Hormone α -MSH β -MSH γ -MSH	MC3 MC4		+	Obesità, disordini metabolici
	ACTH			+	Diagnosi insufficienza renale
Vasopressina/ Ossitocina	Vasopressina (VP)	V_{1A}	+		Ansiolitico
		V_{1B} (V_3)	+		(SSR149415) Ansia
		V_2		+	(Lipressina) Diabete insipido
	Ossitocina (OT)	OT		+	(WAY267464) Ansia
Colecistochinine	Gastrina-34, gastrina-17, gastrina-4	CCK ₂	+		(Lorglumide/LY225910) Diminuzione secrezione gastrica
	CCK-8, CCK-33, CCK-58	CCK ₁	+		(Proglumide) Dolore
		CCK ₂		+	
Somatostatina	SS-12, SS-14, SS-28, antrina	SST ₁₋₅		+	(Octreotide) Acromegalia, tumori tratto intestinale
NPY	NPY	Y1		+	Ansia, dolore
		Y2	+		Ansia, depressione
		Y5	+		Obesità
	PPY	Y4			
	PYY, PYY-(3-36)				
Calcitonina	Calcitonina	CLR		+	Malattia di Paget
	α -CGRP	CLR/RAMP1	+		(Olcegepant/BIBN4096BS, ev; Telcagepant/MK-0974, uso orale; BMS-694153, spray nasale) Eemicrania
	β -CGRP	CLR/RAMP1			
	Adrenomedullina	CLR/ RAMP2/3			
Bombesine	Gastrin releasing peptide (GRP)	BB3		+	(MK5041) Obesità in cani e roditori
	Neuromedina C	BB2	+		Ansia
	Neuromedina B	BB1	+		Ansia

I peptidi sono raggruppati per famiglie. La sigla dei recettori è quella ufficiale IUPHAR. Sono indicate possibili applicazioni cliniche (attuali o proposte) di ligandi con effetto agonista o antagonista.

danno alcuni esempi nella tabella 40.2 e vedi CD: Approfondimento 40.1). Negli approfondimenti in CD vengono illustrate due possibili aree di intervento farmacologico: il controllo di molte funzioni endocrino-metaboliche da parte dei peptidi ipotalamici (vedi CD: Approfondimento 40.2) e il coinvolgimento dei neuropeptidi nella percezione del dolore e nel processo infiammatorio (vedi

CD: Approfondimento 40.3). Tuttavia la manipolazione farmacologica della trasmissione del segnale peptidico deve fare ancora molta strada: gli sforzi dedicati alla ricerca di nuove molecole si sono indirizzati verso sostanze di natura non peptidica, perché i peptidi, facilmente soggetti a idrolisi enzimatica, non possono essere somministrati per os. Inoltre, nel caso dei neuropeptidi

Peptide		Recettore	Antg.	Ag.	Indicazioni cliniche
VIP-Glucagone	VIP, PHM-27/PHI-27, PHV-42	VPAC1		+	(IK312532, RO-251553) Diabete, asma
		VPAC2		+	Infiammazione - Obesità
	PACAP-38, PACAP-27, PRP-48	PAC1		+	Malattie neurodegenerative come Parkinson (analoghi peptidici)
CRH	CRH o CRF	CRF1	+		Depressione, dolore, epilessia, Alzheimer, disturbi cognitivi e alimentari
		CRF2			
	Urotensina	UT			
	Sauvagina	CRF1			
Chinine e tensine	Sostanza P	NK1	+		(Aprepitant/MK-869) Depressione, ansia, emesi
	Neurochinina A	NK2	+		Ansia, depressione
	Neurochinina B o neuromedina K	NK3	+		(Osanetant) Schizofrenia
	Bradichinina	B1	+		Dolore infiammatorio
		B2			
	Angiotensina I, angiotensina II, angiotensina (1-7)	AT1			
		AT2			
	Neurotensina (NT), neuromedina N	NT1		+	Psicosi, dipendenza
		NT2			
		NT3			
Galanine	Galanina, <i>Galanin Message Associated Peptide</i> (GMAP)	GAL1	+		Depressione
		GAL2		+	Depressione, dolore neuropatico, neuroprotezione
		GAL3	+		(SNAP37889) Ansia, depressione
	<i>Galanin-Like Peptide</i> (GALP)				
Altri neuropeptidi	<i>Melanin Concentrating Hormone</i> (MCH)	MCH1	+		(GW803430) Ansia, depressione, obesità, steatosi
		MCH2 (manca nel ratto)			
	Oressina A (hypocretin-1)	OX1	+		Disturbi alimentari
	Oressina B (hypocretin-2)	OX2		+	Disturbi del sonno, narcolessia, tono umore
	CART-(1-39), CART-(42-89)				
	AgRP				
	<i>Prokineticin-1</i> (PK1), <i>Endocrine Gland-Derived VEGF</i> (EG-VEGF)	PKR1	+		Dolore infiammatorio
	<i>Prokineticin-2</i> (PK2)	PKR2			

che agiscono nel sistema nervoso centrale, è necessario avere a disposizione composti che possano attraversare efficacemente la barriera ematoencefalica. Solo pochi peptidi, in genere analoghi di sintesi dei peptidi endogeni, sono attualmente utilizzati in clinica per via iniettiva o come spray nasale. La progettazione di "peptoidi" e lo screening randomizzato di grandi librerie di molecole

non peptidiche hanno fornito antagonisti selettivi per la maggior parte dei recettori conosciuti dei neuropeptidi. Tuttavia le aspettative generate dai risultati ottenuti in vitro e in modelli animali spesso vengono disattese dalla sperimentazione clinica. Quindi soltanto pochi antagonisti di peptidi vengono oggi utilizzati in clinica nonostante il notevole potenziale terapeutico.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ I neuropeptidi sono piccole proteine o polipeptidi che, nel sistema nervoso, fungono da trasmettitori legandosi a recettori accoppiati a G-proteine. Agiscono prevalentemente da neuromodulatori. Spesso sono liberati in associazione con altri peptidi o con trasmettitori non peptidici (cotrasmissione).
- ▶ La sintesi dei neuropeptidi richiede la trascrizione del DNA e la traduzione dell'RNA.
- ▶ Un singolo gene precursore può dare origine a parecchi peptidi diversi o per splicing selettivo dell'mRNA prima della trascrizione o per diverso processamento enzimatico post-traduzionale.
- ▶ Vi sono molti esempi di peptidi strettamente correlati fra loro, derivanti presumibilmente dalla evoluzione divergente di un singolo gene, che presentano localizzazione e funzioni fisiologiche differenti.
- ▶ I neuropeptidi sono sintetizzati come pre-pro-peptidi, proteine di notevoli dimensioni, che subiscono svariate modifiche post-traslazionali. Il prefisso "pre" si riferisce a una sequenza segnale, N-terminale, che indirizza il pro-peptide verso la via della secrezione regolata.
- ▶ I neuropeptidi attivi, contenuti nella sequenza del pro-peptide, vengono prodotti per taglio enzimatico selettivo e per altre modifiche enzimatiche.
- ▶ A differenza dei neurotrasmettitori classici (ammine e amminoacidi) che sono immagazzinati in piccole vescicole sinaptiche, i neuropeptidi vengono accumulati in larghe vescicole elettrondense.
- ▶ Entrambi i tipi di vescicole possono essere presenti nello stesso neurone.
- ▶ I neuropeptidi possono essere secreti a livello sinaptico e/o anche extrasinapticamente. In questo caso possono diffondere a grande distanza negli spazi extracellulari (secrezione volume-dipendente) prima di legarsi a specifici recettori.

Bibliografia essenziale

- ▶ Hokfelt T, Broberger C, Xu Z.D et al. Neuropeptides - an overview. *Neuropharmacology* 2000;39: 1337-56.
- ▶ Nestler EJ, Hyman SE, Malenka RC. *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*. New York: McGraw-Hill Professional, 2008.
- ▶ Salio C, Lossi L, Ferrini F, Merighi A. Neuropeptides as synaptic transmitters. *Cell Tissue Res* 2006;326:583-98.
- ▶ Zhang C, Truong KK, Zhou QY. Efferent projections of prokineticin 2 expressing neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Plos One* 2009;4:1-12.

Il sistema oppioide

Patrizia Romualdi, Sanzio Candeletti

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire le basi teoriche e pratiche per la comprensione delle caratteristiche generali del sistema oppioide
- ▶ Acquisire le nozioni di base sulla fisiologia del sistema oppioide, sugli effetti derivanti da attivazione o blocco esogeni e sulle modificazioni che lo stesso subisce a seguito della somministrazione di farmaci oppiacei
- ▶ Acquisire il concetto che il sistema oppioide rappresenta uno dei sistemi endogeni di estrema importanza nella regolazione della nocicezione e costituisce il target primario dello sviluppo di strumenti terapeutici per il controllo del dolore

Il sistema oppioide rappresenta uno dei sistemi endogeni di neurotrasmissione/neuromodulazione ed è costituito da specifici ligandi di natura peptidica e relativi recettori. Esso è presente a livello del SNC e in periferia ed è coinvolto nella modulazione di differenti e numerose funzioni. Oltre che nella più nota modulazione della trasmissione nocicettiva, questo sistema è coinvolto anche nella regolazione di funzioni gastrointestinali, endocrine e autonome, nei meccanismi di gratificazione e dipendenza, nonché nei processi di memoria e apprendimento.

La sua esistenza rende ragione delle azioni farmacologiche esercitate dall'alcaloide morfina nonché dai suoi derivati, i farmaci oppiacei (vedi **CD**: Approfondimento 41.1. *Farmaci oppiacei*).

Dal punto di vista terminologico, la parola oppiaceo si riferisce a tutte le sostanze naturali contenute nell'oppio e a quelle di sintesi correlate chimicamente alla morfina, capostipite degli analgesici narcotici (termine ora desueto, sostituito genericamente da oppiacei e ancor più recentemente, ma non correttamente, da oppioidi). Infatti, secondo lo sviluppo cronologico delle conoscenze sugli analgesici di questo tipo, intorno agli anni 80 si fece la distinzione tra oppiacei (i farmaci esogeni) e oppioidi (le sostanze endogene che rappresentano i naturali ligandi dei recettori per gli oppioidi); da alcuni anni la terminologia anglosassone usa indistintamente "opioids" per indicare i farmaci che più giustamente si dovrebbero definire "opiates" e quindi oppiacei.

Peptidi oppioidi endogeni

I peptidi oppioidi originano per digestione endopeptidasica di precursori polipeptidici

Dal punto di vista strutturale, i neuropeptidi oppioidi sono brevi sequenze di amminoacidi e rappresentano i ligandi naturali endogeni per i recettori oppioidi.

Tutti i peptidi oppioidi classici possono considerarsi appartenenti a tre famiglie: le encefaline o enkefaline, le endorfine e le dinorfine. Ciascuna famiglia deriva da un distinto precursore: la proencefalina, la proopiomelanocortina (POMC) e la prodinorfina (Figura 41.1). Ciascun precursore, codificato da un corrispondente gene, va incontro a successive idrolisi enzimatiche (processing) che producono sequenze amminoacidiche più brevi, biologicamente attive, in grado cioè di interagire con i recettori oppioidi.

La POMC produce il peptide oppioide β -endorfina e dà anche origine all'ACTH e all' α -MSH, suggerendo l'esistenza di strette correlazioni di tipo neuroendocrino tra il sistema oppioide e le risposte a condizioni di stress (asse ipotalamo-ipofisi-surrene).

La proencefalina produce alcune copie di met-encefalina e una di leu-encefalina. La prodinorfina produce tre peptidi oppioidi principali: la dinorfina A, la dinorfina B e l' α -neendorfina, tutti caratterizzati dall'avere in comune la sequenza della leu-encefalina come primi cinque amminoacidi.

È stato successivamente clonato e isolato un altro precu-

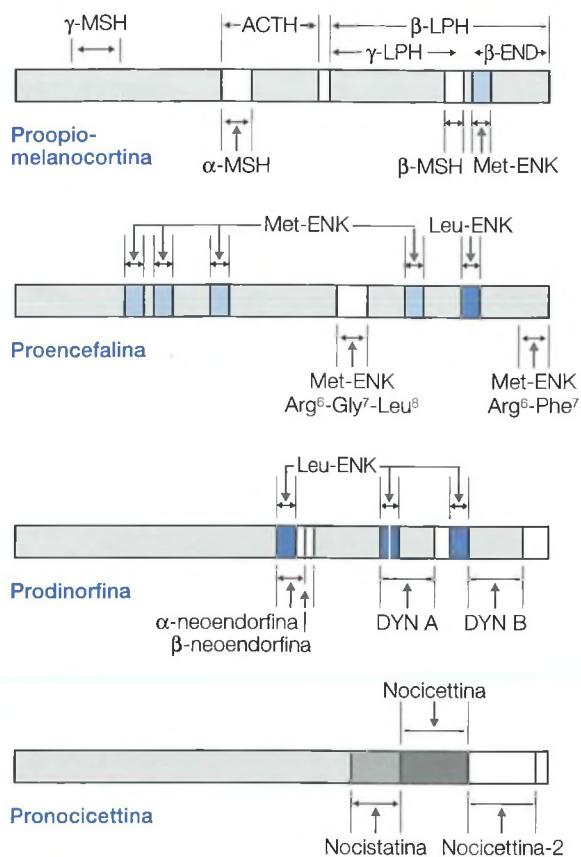


FIGURA 41.1 Rappresentazione schematica dei quattro precursori dei peptidi oppioidi: la prooppiomelanocortina, la proencefalina, la prodinorfina e la pronocicettina. Coppie di aminoacidi basici lisina e arginina rappresentano i punti di attacco da parte di enzimi litici che tagliano i precursori fino a ottenere i peptidi biologicamente attivi.

sore peptidico, la pronocicettina, che produce un peptide denominato nociceptina o orfanina FQ (F: fenilalanina; Q: glutammina, dal codice a singola lettera della nomenclatura degli aminoacidi iniziale e terminale) e che inoltre contiene una seconda sequenza simile alla nociceptina e un terzo peptide denominato nocistatina.

La nociceptina possiede caratteristiche peculiari che la distinguono dagli altri peptidi oppioidi; oggi si ritiene che se dal punto di vista strutturale e filogenetico questo sistema endogeno fa parte del sistema oppioide, dal punto di vista biologico e fisiologico rappresenta un sistema a sé, in grado di operare anche un antagonismo funzionale nei confronti del sistema oppioide classico.

In aggiunta a questi peptidi ormai ben caratterizzati, si trovano in natura altre sequenze aminoacidiche capaci di interagire con i recettori oppioidi: tra queste le deltorfine e le dermorfine, isolate dalla pelle di anfibio, e le endomorfine, tetrapeptidi isolati nel cervello di roditori e dotati di alta affinità e selettività per il recettore μ (Tabella 41.1).

Nel SNC la β -endorfina è localizzata nel nucleo arcuato, nel nucleo del tratto solitario, nella parte dorsale parvocellulare del nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, nel setto ventrale, nel nucleo accumbens, nel talamo

mediale, nell'amigdala mediale, nella sostanza grigia periacqueduttale, nel locus coeruleus e nella formazione reticolare bulbo-pontina. Oltre che nel SNC e nell'ipofisi, la β -endorfina è prodotta in alcuni organi periferici come pancreas, mucosa dell'antro gastrico, placenta, testicolo e midollare del surrene.

Le encefaline sono ampiamente distribuite nel SNC, nei plessi nervosi periferici, nella sostanza midollare del surrene; per quanto riguarda il SNC sono contenute in brevi interneuroni in aree coinvolte nella modulazione della trasmissione nocicettiva (lamina I e II del midollo spinale, nucleo spinale del trigemino, sostanza grigia periacqueduttale), nel controllo del comportamento affettivo e della memoria (nucleo accumbens, amigdala, ippocampo, locus coeruleus, nucleo olfattorio anteriore, corteccia cerebrale), nel controllo dell'attività motoria (substantia nigra, caudato), nella regolazione del sistema nervoso autonomo (midollo allungato) e delle funzioni neuroendocrine (ipotalamo).

La distribuzione delle dinorfine nel SNC è abbastanza simile a quella delle encefaline, anche se in molti casi in popolazioni neuronali distinte. Le dinorfine sono state localizzate nella lamina II del midollo spinale, nel nucleo ipotalamico anteriore i cui assoni proiettano all'ipofisi posteriore, nella formazione reticolare, nel caudato, nell'ippocampo e in diverse regioni della corteccia cerebrale.

La nociceptina è presente nel SNC e nei tessuti periferici (vedi **CD**: Approfondimento 41.2. *La nociceptina*).

La presenza (solo immunochimica) di *endomorfine* è stata dimostrata negli strati superficiali delle corna dorsali del midollo spinale, nel nucleo spinale del trigemino, nel nucleo ambiguo, nel nucleo accumbens, nel setto, nei nuclei talamici, nell'ipotalamo, nell'amigdala, nel locus coeruleus e nella sostanza grigia periacqueduttale.

Recettori oppioidi

I recettori oppioidi sono recettori di membrana accoppiati a differenti proteine G

Esistono tre tipi di recettori oppioidi denominati, secondo la nomenclatura maggiormente consolidata, come μ , δ e κ . Nell'ultimo decennio sono stati attribuiti anche i nomi di OP3, MOP o MOR al recettore μ ; OP1, DOP o DOR al δ ; OP2, KOP o KOR al κ , rispettivamente. Accanto a questi tre recettori, esiste il recettore per la nociceptina, denominato NOP e inizialmente ORL-1 o OP4; tale recettore è considerato correlato ai recettori oppioidi, piuttosto che oppioide in senso stretto dal momento che, malgrado presenti una elevata omologia strutturale con i recettori oppioidi classici, esibisce una differente farmacologia. Infatti, l'attivazione di quest'ultimo recettore provoca, quantomeno a livello soprasspinale, effetti diversi da quelli classicamente attribuibili al sistema oppioide e le evidenze sperimentali finora acquisite hanno condotto a formulare l'ipotesi che il sistema della nociceptina e del suo recettore NOP eserciti una sorta di antagonismo funzionale nei confronti del sistema oppioide.

I tre tipi di recettori oppioidi classici e il recettore NOP

TABELLA 41.1 Peptidi oppioidi endogeni, selettività recettoriale e sequenze aminoacidiche (codice a una lettera)*

		Recettori	Sequenza aminoacidica
Peptidi oppioidi endogeni	Met-enkefalina	δ μ	Y-G-G-F-M
	Leu-enkefalina	δ μ	Y-G-G-F-L
	β -Endorfina	μ δ	Y-G-G-F-M-Y-S-E-K-S-Q-T-P-L-V-T-L-F-K-N-A-I-I-K-N-A-Y-K-K-G-E
	Dinorfina A	κ μ	Y-G-G-F-L-R-R-I-R-P-K-L-K-W-D-N-Q
	Dinorfina B	κ	Y-G-G-F-L-R-R-Q-F-K-V-V-T
	α -Neoendorfina	κ	Y-G-G-F-L-R-K-Y-P-K
	β -Neoendorfina	κ	Y-G-G-F-L-R-K-Y-P
Nuovi peptidi endogeni correlati agli oppioidi	Nocicettina/Orfanina FQ	NOP	F-G-G-F-T-G-A-R-K-S-A-R-K-L-A-N-Q
	Endomorfina-1	μ	Y-P-W-F-NH ₂
	Endomorfina-2	μ	Y-P-F-F-NH ₂

*Il requisito necessario per il legame ai recettori oppioidi consiste nella presenza dell'amminoacido tirosina (Y) in posizione 1, seguita a distanza sterica critica (posizione 3 o 4) dalla fenilalanina (F). La nocicettina manca della Y in posizione 1 e non si lega ai recettori oppioidi classici.

sono gli unici a essere stati clonati a tutt'oggi e quindi, anche se un'ampia letteratura farmacologica basata su studi in vitro e in vivo ha proposto l'esistenza di sottotipi per ciascuno dei tre recettori, le informazioni di biologia molecolare non ne avvalorano l'esistenza.

Si può ritenere che l'ipotesi dell'esistenza di fenomeni, quali la eterodimerizzazione tra i differenti tipi di recettori (o tra questi e altri recettori a 7TM) o lo "splicing" alternativo del loro mRNA, possa essere alla base delle discrepanze tra le diverse proprietà farmacologiche di numerosi ligandi sintetici e naturali da un lato e le evidenze molecolari dall'altro.

Infine, è stato identificato un recettore a cui si lega la met-enkefalina, dotato di caratteristiche strutturali diverse dai recettori classici e denominato OGFR (*Opioid Growth Factor receptor*), capace di esercitare un controllo inibitorio sulla proliferazione cellulare e sull'organizzazione dei tessuti.

Trasduzione del segnale

Tutti i recettori oppioidi appartengono alla superfamiglia dei recettori di membrana a sette domini, accoppiati alle proteine G (GPCR), subunità α i/o e la loro attivazione inibisce l'effettore adenilato ciclastasi (AC) con conseguente inibizione della produzione di cAMP. La stimolazione di recettori oppioidi μ presinaptici riduce la liberazione depolarizzazione-dipendente di neurotrasmettitori inibendo i canali del Ca²⁺ di tipo N, mentre la stimolazione dei recettori μ postsinaptici produce iperpolarizzazione attivando i canali del K⁺ e inibendo i canali del Ca²⁺ di tipo L. In tal modo gli oppioidi tendono a inibire la trasmissione neuronale e quindi, ad esempio, la trasmissione degli impulsi generati da stimoli nocicettivi.

Per molti anni si è ritenuto che i recettori oppioidi fossero accoppiati solo alle proteine inibitorie G _{α i/o}, sensibili alla tossina della pertosse (PTX). I recettori μ , δ e κ hanno la capacità di interagire con cinque diverse isoforme di G _{α i/o} (G_{T1-3} e G_{OA-B}), regolando così una trasduzione del segnale con effettori diversi tra i quali l'adenilato ciclastasi (AC1, 5, 6, 8), canali ionici e la via delle MAP chinasi (proteine chinasi attivate da mitogeni).

È stato inoltre dimostrato che tutti e tre i recettori oppioidi

possono trasdurre il segnale inibitorio anche attraverso proteine G insensibili alla tossina della pertosse, quali le proteine G _{α s}, unico rappresentante delle G _{α i} a essere insensibile alla PTX, perché mancante del residuo di cisteina nella porzione carbossiterminale, sito per la ADP-ribosilazione catalizzata da PTX. G _{α s} è espressa nel tessuto nervoso e colocalizzata con i recettori oppioidi in linee cellulari neuronali; è accoppiata con il recettore μ nella PAG dove media l'analgia soprasspinale. G _{α s}, oltre a inibire l'attività dell'AC, è in grado di regolare l'attività delle MAPK, dei canali al Ca²⁺ e K⁺ e di interagire con numerosi effettori di recente identificazione appartenenti alla famiglia delle RGS (*Regulator G protein Signalling*) come GRIN (*G-Protein-Regulated Inducers of Neurite outgrowth*), Rap1GAP (*Rap1-specific GTPase Activating Protein*). Oltre a G _{α s}, i recettori oppioidi possono trasdurre mediante altre proteine G insensibili alla PTX, come G _{α 14} e G _{α 16}, attivando a cascata una trasduzione del segnale mediata dalla stimolazione della fosfolipasi C (PLC β) normalmente attivate da proteine G _{α q}, con attivazione delle JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) e conseguente influenza sulla crescita cellulare. La loro distribuzione, ristretta alle cellule ematopoietiche e ai tessuti periferici, suggerisce un loro ruolo nell'attività immunomodulatoria degli oppioidi.

È stata anche suggerita la capacità di oppioidi e oppiacei di modulare alcune delle loro azioni, come analgesia, tolleranza e dipendenza, attraverso la subunità G _{α s} e la dimostrazione recente che il recettore μ in cellule CHO trasduce il segnale di formazione delle caveole attraverso una G _{α s} lo conferma.

In colture primarie di neuroni sensitivi trigeminali, la regolazione della localizzazione del recettore μ e del suo signalling può essere influenzata anche da integrine che ne determinano l'accoppiamento con una proteina G piuttosto che con un'altra (passando, ad esempio, da una G _{α i} a una G _{α s}).

Il complesso G _{β γ} che si stacca dalla α gioca un ruolo molto importante nella diversificazione della trasduzione del segnale attivato dagli oppioidi, così come per altri GPCR. Infatti è stato dimostrato che un numero elevato di effettori e proteine coinvolte nella trasduzione del segnale può interagire funzionalmente con le subunità G _{β γ} , determinando

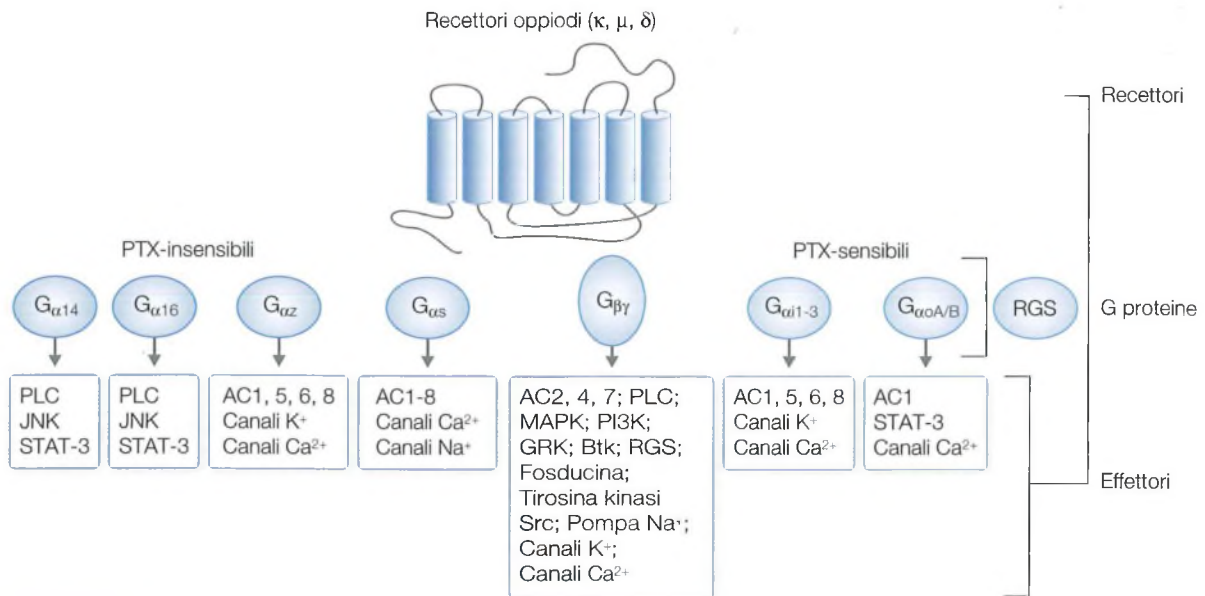


FIGURA 41.2 Differenti vie di trasduzione del segnale attivate dai recettori oppioidi. I recettori oppioidi sono accoppiati a proteine G sensibili o insensibili alla tossina della pertosse (PTX). L'attività GTPasica di $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha o}$ e $G_{\alpha z}$ viene modulata da proteine RGS (Regulators of G-protein Signalling). AC: adenilato ciclasi; STAT-3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3; PLC: fosfolipasi C; MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase; PI3K: Phospho Inositide 3-Kinase; GRK: G-protein-coupled Protein Kinase; Btk: Burton's tyrosine kinase; JNK: c-Jun N-terminal Kinase.

un'ampia gamma di risposte biologiche (Figura 41.2), anche di direzione opposta a quelle innescate dalla subunità $G_{\alpha s}$: ad esempio, la produzione di cAMP a opera dell'AC2 sarebbe regolata in direzione opposta da $G_{\beta\gamma}$ e da $G_{\alpha i}$. I canali GIRK (*G protein coupled Inwardly Rectifying K^+ channels*) di tipo 3 sono attivati dall'interazione diretta con le subunità $\beta\gamma$ dopo stimolazione dei GPCR e questo fenomeno è considerato parte del meccanismo di inibizione oppioide della trasmissione nocicettiva.

Generalmente, i tre recettori oppioidi μ , δ e κ sono accoppiati a proteine $G_{\alpha o}$ e $G_{\alpha i 2}$, con differenze legate in parte al tipo di tessuto o di cellule in cui sono espressi. Ad esempio, il recettore μ espresso nei neuroni sensitivi dei DRG trasduce mediante una subunità $G_{\alpha o}$, mentre quando è localizzato in aree cerebrali risulta preferenzialmente accoppiato a proteine $G_{\alpha i 1-3}$. Il recettore κ attiva preferenzialmente le subunità $G_{\alpha o}$, mentre il recettore δ attiva le proteine $G_{\alpha i 1}$.

È infine possibile che a seguito del legame di agonisti differenti, dotati di diversa attività intrinseca, il recettore possa assumere conformazioni variabili che determinano la formazione e la stabilizzazione di complessi recettore/proteina G di un particolare tipo, inducendo così una specifica trasduzione del segnale.

Inoltre, in anni recenti si è fatta strada la dimostrazione che i recettori oppioidi vadano incontro a dimerizzazione formando omo- ed etero-dimeri, tra loro e anche con altri recettori a 7TM della famiglia dei GPCR. Questo fenomeno può causare modificazioni dell'affinità dei ligandi, dei meccanismi di trasduzione del recettore e della sua dinamica localizzazione cellulare (trafficking); tuttavia il reale peso funzionale del fenomeno è ancora incerto. La disponibilità di ligandi capaci di interagisce selettiva-

mente con tali forme alternative dei recettori oppioidi, e quindi di studiarne l'eventuale localizzazione tissutale nonché le dinamiche di assemblaggio e il loro trafficking, consentirebbe lo sviluppo di analgesici che producono meno tolleranza e dotati di minori effetti collaterali.

Queste diverse cascate di segnali vanno incontro a processi di adattamento qualora l'attivazione del recettore si realizzi con un'esposizione prolungata all'agonista. Nel paragrafo relativo alla modulazione si approfondiranno i rapporti tra questi processi adattativi e il manifestarsi di fenomeni quali la tolleranza.

Distribuzione dei recettori oppioidi

I recettori oppioidi sono ampiamente distribuiti nel SNC e sono presenti anche in periferia. La loro localizzazione in aree cerebro-spinali deputate al controllo di specifiche funzioni illustra i ruoli fisiologici esercitati del sistema oppioide endogeno e spiega gli effetti farmacologici degli oppiacei. I recettori di tipo μ sono i più diffusi e abbondanti e mediano la maggior parte degli effetti farmacologici degli analgesici oppiacei (vedi CD: Approfondimento 41.3. Distribuzione dei recettori oppioidi).

Effetti degli oppioidi

Le funzioni modulate dal sistema oppioide endogeno sono farmacologicamente esplorabili e definibili mediante l'impiego di ligandi esogeni rappresentati dagli alcaloidi dell'oppio e loro derivati nonché mediante molecole sintetiche capaci di agire da antagonisti nei confronti dei recettori oppioidi. I peptidi oppioidi derivanti dai

tre precursori POMC, proencefalina e prodinorfina manifestano una moderata selettività nei confronti dei loro recettori, mentre le endomorfine I e II sono altamente selettive per il recettore μ così come le dermorfine e le deltorfine per il δ .

Modulazione della trasmissione nocicettiva

Analgesia attraverso meccanismi centrali

Nel SNC, i principali sistemi neuronali deputati alla trasmissione, alla modulazione e al controllo della nocicezione sono rappresentati dal sistema ascendente spino-talamo-corticale e dal sistema discendente encefalo-spinale. La localizzazione strategica dei recettori oppioidi nonché le caratteristiche del loro sistema di trasduzione conferiscono al sistema oppioide endogeno un importante e precipuo ruolo di modulazione delle afferenze nocicettive e la capacità di produrre analgesia.

Tramite l'attivazione di specifiche strutture (nocicettori) poste all'estremità terminale di fibre afferenti primarie di piccolo diametro (fibre C e fibre A δ), gli stimoli di elevata intensità (stimoli nocicettivi) e di differente natura (termica, meccanica e chimica) generano potenziali d'azione che, in direzione centripeta e lungo tali fibre, giungono alle corna dorsali del midollo spinale.

In questa sede, le lamine II e III delle corna dorsali (sostanza gelatinosa, SG) contengono interneuroni che producono e possono liberare peptidi oppioidi (encefaline, dinorfine). Questi ultimi sono quindi in grado di regolare/inibire la trasmissione tra le fibre afferenti primarie e i neuroni del tratto spino-talamico mediante recettori oppioidi presenti su due sedi: presinapticamente, sul terminale spinale del neurone di primo ordine o postsinapticamente sul neurone di secondo ordine (spino-talamico).

Il sistema inibitorio discendente origina dai neuroni della sostanza grigia periacqueduttale (PAG) che ricevono impulsi di controllo dalla corteccia, dall'ipotalamo e, soprattutto, dal talamo. I neuroni della PAG proiettano su alcuni nuclei del midollo allungato, come il nucleo magno del rafe (NRM), il nucleo reticolare magnocellulare (NRMC) e il nucleo reticolare paragigantocellulare (NRPG). Da qui originano fibre discendenti a mediazione aminergica che decorrono nel funicolo dorso-laterale del midollo spinale e terminano nella SG (Figura 41.3); in questa sede, esse influenzano la trasmissione nocicettiva afferente, in parte direttamente e in parte mediante l'attivazione degli interneuroni oppioidi (teoria del cancello).

Gli effetti analgesici degli oppioidi, nonché dei farmaci oppiacei, sono dovuti alla loro capacità di inibire direttamente la trasmissione ascendente degli impulsi nocicettivi dalle corna dorsali del midollo e di attivare i circuiti di controllo del dolore che scendono dal talamo alle corna dorsali. A livello spinale la maggior parte dei recettori μ , δ e κ sono localizzati presinapticamente sui terminali dei nocicettori afferenti primari. Nelle vie inibitorie discendenti i recettori μ e κ sono sempre coespressi, mentre i recettori δ sono maggiormente concentrati nella PAG, nell'NRM e nel talamo. Sempre a livello soprasspinale i recettori μ e κ sono concentrati nel locus coeruleus (Figura 41.3).

L'attivazione di recettori μ provoca sempre analgesia, ad esempio nel sistema discendente mediante rimozione dell'inibizione GABAergica sui neuroni della PAG che proiettano al midollo; diversamente, l'attivazione dei recettori κ può dare analgesia ma anche iperalgesia, ad esempio inibendo gli stessi neuroni discendenti dalla PAG.

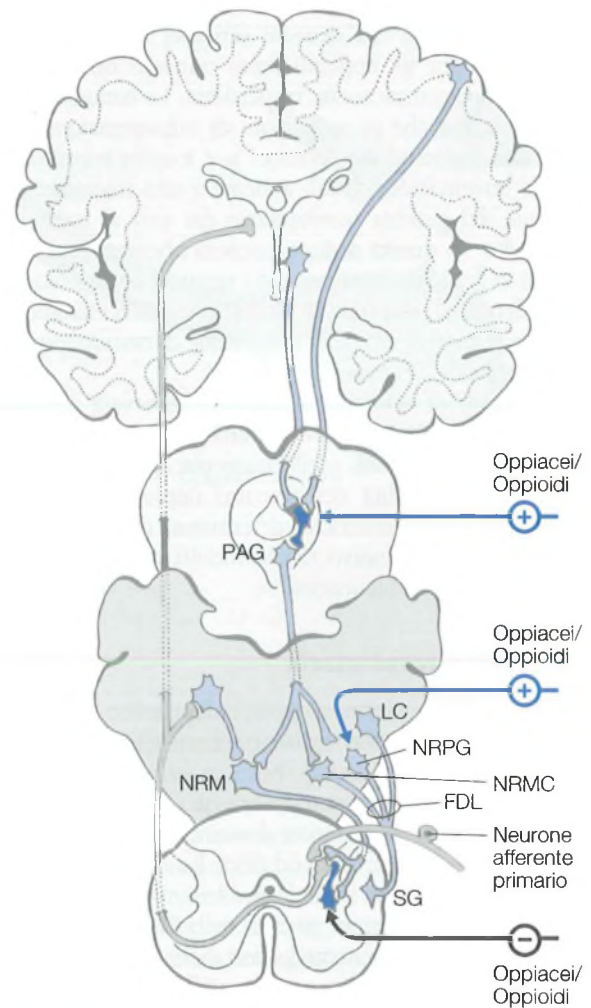


FIGURA 41.3 Illustrazione schematica delle vie inibitorie discendenti deputate al controllo delle afferenze nocicettive. I neuroni della sostanza grigia periacqueduttale (PAG) ricevono impulsi di controllo dalla corteccia (+/-), dal talamo (+) e dall'ipotalamo (+/-). I neuroni della PAG proiettano, nel midollo allungato, sul nucleo magno del rafe (NRM) e sul nucleo reticolare magnocellulare (NRMC). Da qui originano fibre discendenti che giungono alla sostanza gelatinosa (SG) del midollo spinale attraverso il funicolo dorso-laterale (FDL). Altre proiezioni spinali rilevanti ai fini del controllo del dolore partono dal nucleo reticolare paragigantocellulare (NRPG), a sua volta controllato dalla PAG, e da gruppi di cellule noradrenergiche ponto-midollari (locus coeruleus, LC). L'NRM riceve segnali di attivazione dall'adiacente NRPG che a sua volta viene attivato da impulsi portati attraverso i fasci ascendenti spino-talamici. I neuroni nocicettivi spinali subiscono quindi il controllo inibitorio delle vie discendenti per afferenza sia diretta sia per afferenza mediata da interneuroni della SG. In azzurro: sistema inibitore discendente; in grigio: neuroni ascendenti spino-talamici; in blu: interneuroni contenenti peptidi oppioidi.

È da tenere in conto che l'analgesia complessiva imputabile al sistema oppioide risulta dall'insieme degli effetti sulla trasmissione degli impulsi e dagli effetti di alterazione della reazione emotiva agli stimoli stessi (vedi **CD**: Approfondimento 41.4. *Basi neurobiologiche del dolore acuto e cronico*).

Analgesia attraverso meccanismi periferici

La presenza di recettori oppioidi a livello delle terminazioni periferiche dei neuroni sensitivi ha suggerito la possibilità che gli oppioidi siano coinvolti nella modulazione nocicettiva anche in periferia. Le conoscenze attuali indicano che in condizioni di infiammazione si registra un aumento dei recettori μ e κ sulla membrana delle terminazioni distali assieme a una migrazione di cellule del sistema immunitario dai vasi al tessuto infiammato. In questa sede, i leucociti liberano peptidi oppioidi in grado di interagire con i recettori up-regolati e di produrre analgesia tramite l'inibizione dell'eccitabilità dei nervi sensoriali e/o della liberazione di neuropeptidi proinfiammatori (Figura 41.4).

In condizioni di infiammazione, si è osservata anche una minore tolleranza all'effetto analgesico di agonisti oppiacei somministrati perifericamente, grazie a una maggiore disponibilità dei recettori oppioidi presenti sulle terminazioni periferiche, determinata dall'aumento di endocitosi e successivo riciclo indotti dagli oppioidi endogeni liberati dai leucociti.

Depressione respiratoria

I peptidi oppioidi e i farmaci oppiacei deprimono la respirazione attraverso un effetto diretto sul centro respiratorio del tronco cerebrale.

L'attivazione dei recettori oppioidi μ determina una marcata inibizione dei neuroni dei centri respiratori nel midollo allungato che, in condizioni fisiologiche, innescano l'atto respiratorio in risposta allo stimolo costituito dall'aumento della tensione parziale della CO_2 nel sangue, prodotto dai processi energetici metabolici. La morfina, somministrata a dosi terapeutiche nell'uomo, deprime frequenza, volume e scambi respiratori e può anche determinare respiro irregolare e periodico. Tale effetto risulta dose-dipendente e può portare a morte per arresto respiratorio; tuttavia, alle dosi terapeutiche di morfina, raramente si verifica una depressione respiratoria clinicamente significativa.

Effetti cardiovascolari

Sperimentalmente, l'attivazione dei recettori oppioidi determina effetti contrastanti a carico della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca a seconda della dose di agonista, della via di somministrazione e del sito di iniezione nonché di condizioni di anestesia o di stress. Nell'uomo in posizione supina, dosi terapeutiche di oppiacei non alterano marcatamente la pressione sanguigna, la frequenza e il ritmo cardiaco. Tuttavia possono verificarsi

ipotensione ortostatica e svenimento dal momento che possono indurre vasodilatazione periferica, riduzione delle resistenze periferiche e inibizione dei riflessi barocettivi. La dilatazione periferica arteriolare e venosa prodotta da morfina coinvolge diversi meccanismi, tra i quali il rilascio di istamina.

Effetti sulla motilità viscerale

L'attivazione dei recettori oppioidi μ ritarda lo svuotamento gastrico, aumentando così la possibilità di reflusso esofageo e, a livello intestinale, determina un sensibile aumento del tono muscolare e una marcata diminuzione delle onde peristaltiche propulsive del tenue e del crasso. Gli effetti gastrointestinali (GI) della morfina sono conseguenza della sua azione sia centrale sia periferica. La stimolazione dei recettori μ , δ e κ a livello dei plessi nervosi intramurali determina iperpolarizzazione secondaria all'aumento della conduttanza al potassio e blocca la liberazione di acetilcolina. Tuttavia, anche la somministrazione intracerebroventricolare (icv) o intratecale (it) di agonisti μ inibisce l'attività propulsiva dell'intestino purché l'innervazione estrinseca sia intatta.

La tolleranza agli effetti GI della morfina è scarsa e la costipazione costituisce un grave effetto collaterale del suo uso cronico, soprattutto con le formulazioni orali.

La somministrazione di dosi analgesiche di morfina aumenta la pressione nel tratto biliare a causa della costrizione dello sfintere di Oddi.

La stimolazione dei recettori μ e δ cerebrali e spinali inibisce il riflesso di svuotamento della vescica urinaria e aumenta il tono dello sfintere vescicale. La stimolazione dei recettori κ favorisce la diuresi. Dosi terapeutiche di morfina prolungano il travaglio del parto.

Effetti sull'assunzione di cibo e sulla temperatura corporea

I peptidi oppioidi e gli oppiacei sono in grado di influenzare l'assunzione di cibo e liquidi. È noto infatti che gli agonisti oppiacei stimolano l'assunzione di cibo mentre gli antagonisti la inibiscono.

Dati recenti indicano che il sistema oppioide possa svolgere un ruolo non solo nel controllo della quantità di cibo ingerito ma anche nella sua palatabilità, ovvero la sua scelta sulla base del gradimento. Questo suggerisce un coinvolgimento del sistema oppioide nei circuiti della gratificazione attivati sia nel controllo dell'assunzione di cibo sia da sostanze capaci di indurre comportamenti di abuso. I peptidi oppioidi influenzano i meccanismi ipotalamici di regolazione della temperatura con effetti variabili e correlati alla temperatura esterna. Gli agonisti μ elevano la temperatura corporea dei soggetti esposti a temperature ambientali superiori a 30 °C e gli agonisti μ e δ diminuiscono la temperatura corporea di soggetti esposti al freddo (4 °C). Probabilmente, la regolazione della temperatura corporea è intimamente connessa con la modulazione del comportamento consumatorio.

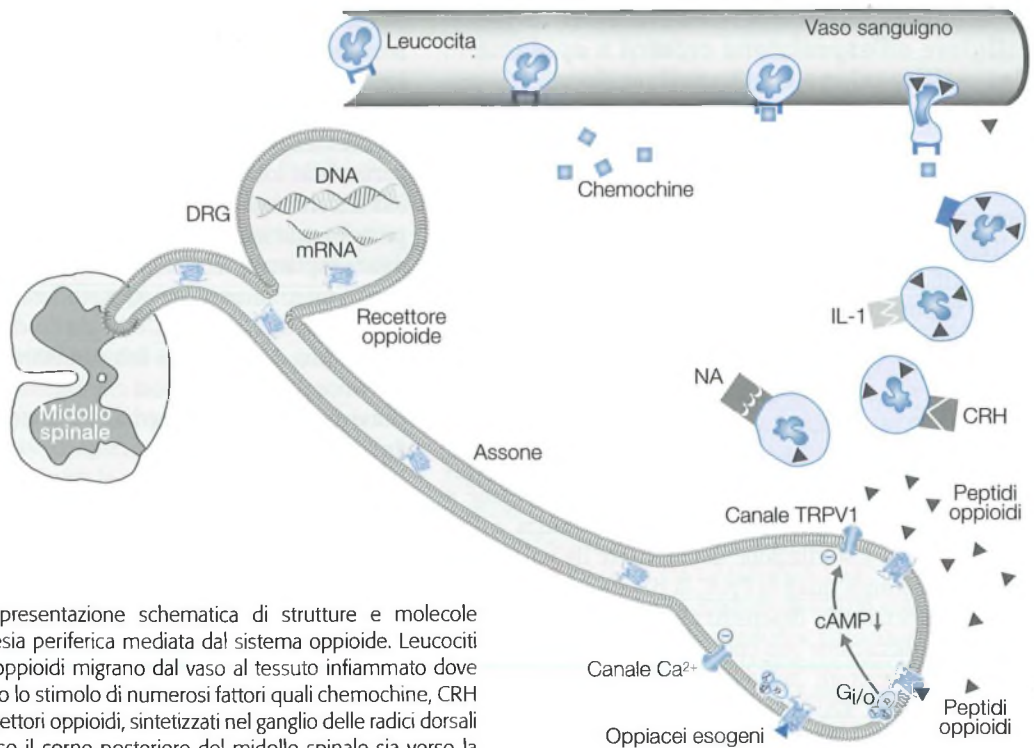


FIGURA 41.4 Rappresentazione schematica di strutture e molecole coinvolte nell'analgesia periferica mediata dal sistema oppioide. Leucociti contenenti peptidi oppioidi migrano dal vaso al tessuto infiammato dove liberano peptidi sotto lo stimolo di numerosi fattori quali chemochine, CRH e noradrenalina. Recettori oppioidi, sintetizzati nel ganglio delle radici dorsali e trasportati sia verso il corno posteriore del midollo spinale sia verso la terminazione periferica del neurone afferente primario, in condizioni di infiammazione aumentano la loro espressione e sono disponibili per il legame sia con i peptidi oppioidi liberati sia con molecole esogene applicate in periferia. (Da: Busch-Dienstfertig M, Stein C. Brain Behav Immun 2010;24:683-94, modificata)

Effetti sul sistema immunitario

Diverse cellule del sistema immunitario producono peptidi derivanti dalla POMC, dalla proencefalina e anche dalla pronocicettina. La β -endorfina aumenta l'attività citostatica dei monociti umani e il reclutamento delle cellule precursori a cellule killer; esercita inoltre un potente effetto chemotattico. Numerosi peptidi oppioidi esercitano effetti naloxone-sensibili sulla funzione dei macrofagi e dei monociti, mentre la morfina produce essenzialmente inibizione della formazione di rosette di linfociti. Negli animali da esperimento sopprime l'attività citostatica delle cellule NK e favorisce la crescita dei tumori impiantati.

Gli effetti degli oppiacei sul sistema immunitario sono complessi e sono in parte da ascrivere ad azioni dirette sulle cellule del sistema immunitario e in parte a meccanismi neuronali a mediazione centrale. In generale l'effetto complessivo è di natura immunosoppressiva con differenze, anche sensibili, tra i vari farmaci.

Tolleranza e dipendenza fisica agli oppiacei

La tolleranza e la dipendenza fisica sono due fenomeni farmacologici che si sviluppano in seguito all'esposizione cronica a oppiacei. La tolleranza consiste nella riduzione

dell'effetto farmacologico dopo somministrazioni ripetute di agonisti dei recettori oppioidi e richiede la necessità di aumentare la dose per ottenere lo stesso effetto. La dipendenza fisica si instaura quando raggiungendo dosaggi molto superiori a quelli iniziali l'organismo perde la sua omeostasi; in queste condizioni si verificano alterazioni del suo equilibrio che, alla brusca interruzione della somministrazione dell'agonista, determinano l'insorgenza della crisi di astinenza. Questi due fenomeni sono quindi correlati fra di loro e, come si vedrà in seguito, indipendenti dalla dipendenza psichica. Per molti anni si è sostenuto che la tolleranza fisica agli oppiacei fosse la conseguenza di processi di adattamento cellulare come la desensitizzazione acuta e la down-regulation dei recettori con conseguente riduzione del numero dei recettori funzionali presenti sulla membrana cellulare. Oggi si ritiene che i fenomeni di adattamento neuronale agli effetti cronici degli oppiacei coinvolgano una complessa serie di eventi molecolari e cellulari, di direzioni anche opposte tra loro, in cui la modulazione del recettore rappresenta solo il primo gradino. L'adattamento cellulare post-recettoriale più studiato e confermato da evidenze sperimentali consiste nella superattivazione della α_1 del cAMP, con aumento nelle proteine CREB e Fos, che può essere considerata la base molecolare della risposta omeostatica alla inibizione prolungata dell'AC, conseguente alla esposizione cronica agli agonisti oppiacei.

Meccanismi molecolari di adattamento cellulare all'esposizione cronica a oppiacei: desensitizzazione e internalizzazione

La tolleranza si può osservare sia quando l'esposizione dell'agonista al recettore si verifica per breve tempo (tolleranza acuta), sia quando è prolungata (tolleranza cronica); in entrambi i casi, si determina una diminuzione dell'effetto a valle. Le evidenze dell'ultimo decennio hanno modificato le teorie classiche sulla tolleranza aggiungendo importanti informazioni soprattutto in relazione ai meccanismi cellulari che sottendono le fasi più precoci di questo complesso fenomeno.

In analogia con altri recettori appartenenti alla famiglia dei GPCR, è stato dimostrato che il legame di un agonista al recettore oppioide, oltre ad attivare la trasduzione del segnale, determina anche eventi di desensitizzazione a breve termine che possono portare a tolleranza e che coinvolgono la fosforilazione del recettore da parte della PKC e altre chinasi quali la PKA, la β -ARK.

Successivamente alla desensitizzazione si può verificare una internalizzazione con endocitosi e, dipendentemente dal tipo di recettore, si possono attivare vie diverse di traffico cellulare. Recentemente si è compreso che ligandi

diversi possono determinare l'attivazione di vie intracellulari differenti, giustificando la diversa efficacia dei differenti agonisti, sia quelli endogeni sia i farmaci e, probabilmente, anche il diverso potenziale d'abuso di questi ultimi.

L'internalizzazione dei recettori oppioidi è mediata in parte dalle chinasi dei recettori accoppiati a proteina G (GRK), che fosforilano i recettori occupati dall'agonista, promuovendone l'interazione con le β -arrestine che disaccoppiano il recettore dalla proteina G e ne promuovono l'internalizzazione. Questo fenomeno non avviene per la morfina, che non è in grado di fare traslocare la β -arrestina e quindi non determina internalizzazione del recettore. Si conferma così che l'attivazione della trasduzione del segnale e la internalizzazione del recettore sono due meccanismi distinti.

Superattivazione dell'adenilato ciclasi

La tolleranza cronica è stata associata a livello molecolare a una superattivazione dell'adenilato ciclasi (con aumenti dei livelli di cAMP) e ad adattamenti delle subunità α_i/o e del complesso $\beta\gamma$ delle proteine G. La superattivazione di AC indotta dagli oppioidi è isoenzima specifica: AC2 e AC4 verrebbero attivati direttamente dal complesso

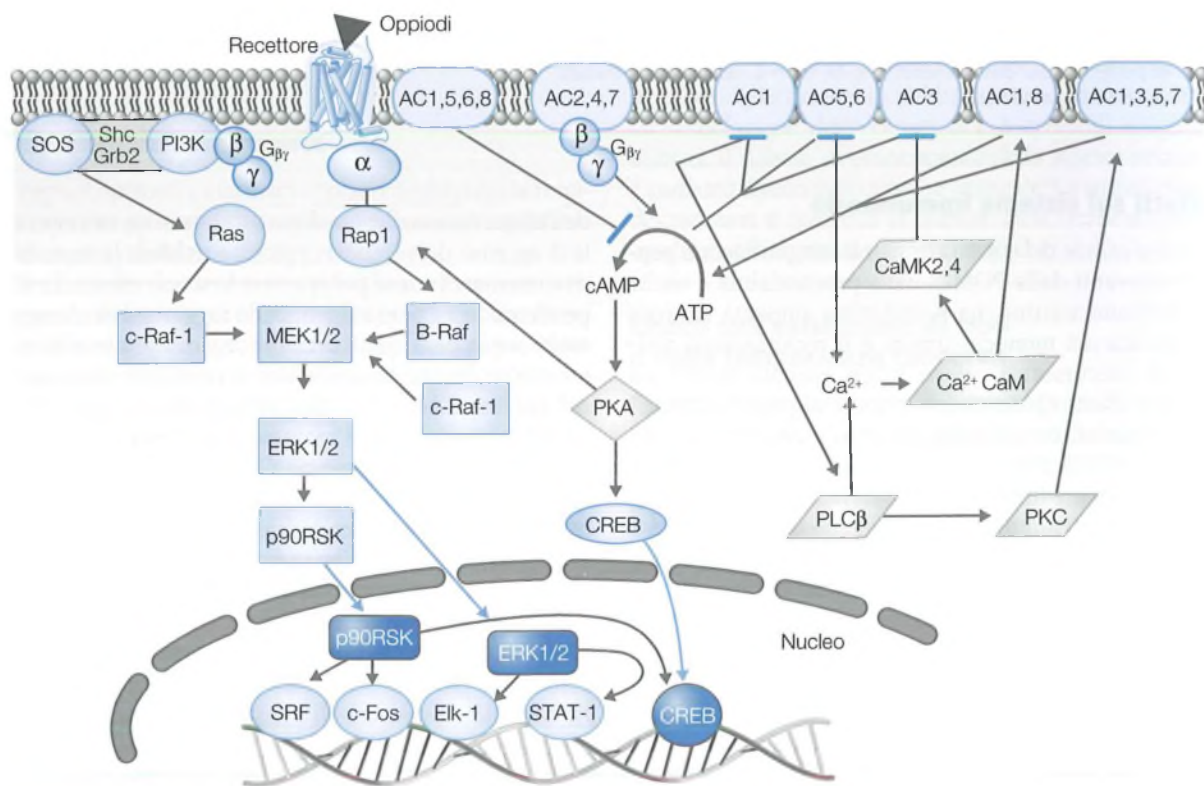


FIGURA 41.5 Vie di trasduzione del segnale che collegano i recettori oppioidi ad AC (adenilato ciclasi), CREB (*cAMP Responsive Element-Binding protein*), MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) e differenti fattori di trascrizione. Le proteine G α_i/o sopprimono la PKA (*cAMP-dependent Protein Kinase*) inibendo AC1, 5, 6 e 8. Il complesso G $\beta\gamma$ stimola direttamente AC2, 4 e 7, ma inibisce AC1. Inoltre, G $\beta\gamma$ inibisce AC1, 3, 5 e 6 attraverso la mobilizzazione di Ca $^{2+}$ mediata da fosfolipasi C β (PLC β) e attivazione di calmodulina-chinasi 2,4 (CaMK2,4), ma stimola AC1 e 8 attraverso Ca $^{2+}$ /calmodulina attivata dalla PLC β e stimola AC1-3, 5 e 7 attraverso la PKC. L'attività di CREB è regolata dalla cascata delle MAPK attraverso β -Raf o c-Raf-1. I recettori oppioidi possono modulare la cascata delle MAPK e diversi eventi trascrizionali non solo attraverso le proteine G α_i/o , ma anche attraverso G $\beta\gamma$ in seguito al reclutamento di PI3K (fosfatidilinositolo 3-kinasi), Shc, Grb2 e SOS.

$G_{\beta\gamma}$, mentre AC 1, 5, 6, e 8, anch'essi superattivati in seguito a trattamento cronico con oppiacei, lo sarebbero indirettamente attraverso effettori a loro volta regolati da $G_{\beta\gamma}$, come ad esempio CREB (*Cyclic AMP-Responsive Element DNA-Binding protein*), MAPK (regolate in maniera Ras-dipendente) o JNK (Figura 41.5). Inoltre molte altre proteine che fanno parte del sistema di trasduzione del segnale sono upregolate e tra queste le proteine regolatrici del segnale dei GPCR, denominate RGS, di cui sono state individuate numerose differenti isoforme.

Rapporti tra stimolazione dei recettori e loro endocitosi

Recenti evidenze sperimentali hanno modificato la teoria classica dello sviluppo di tolleranza agli oppioidi: agonisti diversi, pur attivando tutti la trasduzione del segnale del recettore oppioide μ , determinano risposte biochimiche ampiamente diversificate: ad esempio la morfina e altri agonisti a bassa efficacia non promuovono l'internalizzazione dei recettori μ , mentre altri agonisti lo fanno molto rapidamente. Questo significa che i fenomeni di desensitizzazione e di down-regulation del recettore μ sono agonista-dipendenti e implicano diverse configurazioni del recettore determinate da ligandi stereochimicamente diversi e generano cascate di eventi cellulari diversificati a valle. Così come altri recettori GPCR, la successiva endocitosi o internalizzazione potrebbe portare da un lato alla loro degradazione o dall'altro alla loro defosforilazione e riciclo sulla membrana cellulare. Questo significa che l'internalizzazione del recettore può portare alla riduzione del segnale per inattivazione del recettore e sua degradazione, oppure, alternativamente, all'intensificazione del segnale attraverso la riattivazione dei recettori riportati sulla membrana e quindi riutilizzabili.

In conclusione, si ritiene che la tolleranza agli effetti degli oppiacei sia correlata non alla desensitizzazione recettoriale, ma alla sua mancanza. Così la morfina non inducendo internalizzazione non favorisce il recupero dei recettori riciclati e determina maggiori adattamenti a valle che incrementano la tolleranza cronica ai suoi effetti. A questo proposito è stato proposto un nuovo parametro denominato RAVE (*Relative Agonist Versus Endocytosis*) e la misurazione di questo rapporto tra il signalling dell'agonista oppioide (inteso come capacità di attivare le correnti di K^+) rispetto alla sua capacità endocitotica (ovvero di indurre internalizzazione) potrebbe rappresentare uno strumento moderno ed efficace per prevedere il potenziale sviluppo della tolleranza per ogni specifico agonista. Infatti, studi recenti in vitro e anche in vivo hanno dimostrato che la morfina avendo un alto rapporto RAVE (poiché non internalizza) sviluppa molto prima la tolleranza, mentre altri agonisti oppioidi μ , come fentanil o DAMGO, avendo un basso rapporto RAVE (dal momento che inducono rapida internalizzazione) sviluppano minore tolleranza. In tal senso si è osservato che l'aggiunta di basse dosi di fentanil o DAMGO alla morfina provoca un rallentamento dello sviluppo di tolleranza all'effetto analgesico dell'alcaloide, in quanto attiva il riciclo dei recettori che ritornano disponibili per essere occupati.

Queste interessanti osservazioni permetteranno a breve di comprendere le differenze tra la modulazione endogena del sistema oppioide e la sua attivazione da parte di farmaci al fine di attuare strategie terapeutiche e sviluppare farmaci analgesici dotati di minori effetti indesiderati come tolleranza e dipendenza fisica.

Meccanismi molecolari dell'astinenza

Alla sospensione di un trattamento cronico con oppiacei si evidenzia una grave sindrome di astinenza caratterizzata da ricerca del farmaco, agitazione, nausea, vomito, dolori muscolari, crampi, disforia, insonnia, diarrea, piloerezione e sudorazione. La varietà e la gravità di questi sintomi contribuisce alla ricaduta nell'abuso.

Tra i meccanismi molecolari proposti, il trattamento cronico con oppiacei determina una up-regulation del cAMP in numerosi nuclei cerebrali. Tale sovraregolazione compensatoria della via cAMP-PKA nell'NA aumenta la trascrizione di dinorfina mediata da CREB, causando una marcata stimolazione dei recettori κ presinaptici nell'NA con inibizione della liberazione di dopamina, contribuendo in tal modo alla disforia tipica della sindrome di astinenza da oppiacei. Poiché l'attività del locus coeruleus, il nucleo cerebrale più ricco di neuroni adrenergici, è associata alle manifestazioni somatiche della sindrome di astinenza e poiché la somministrazione cronica di oppiacei in questo nucleo produce una aumentata attivazione della via cAMP-PKA-CREB, anche questo meccanismo contribuisce alla manifestazione della disforia e dei sintomi somatici della sindrome da astinenza.

Regolazione della trascrizione genica da parte degli oppiacei

È stato dimostrato che il trattamento con oppiacei produce modifiche nell'espressione genica di numerose proteine, neurotrasmettitori e mediatori in differenti tessuti e cellule. Queste alterazioni dell'attività trascrizionale, producendo modifiche stabili nella espressione genica di molecole funzionali coinvolte nella neurotrasmissione e di molecole strutturali coinvolte nella formazione di sinapsi dei singoli neuroni, possono far parte degli adattamenti cellulari e molecolari di lunga durata che si verificano durante tolleranza e dipendenza.

I fenomeni maggiormente conosciuti sono: la sovraregolazione dell'espressione di alcuni componenti molecolari del circuito trasduzionale del cAMP, l'espressione di nuove isoforme dei fattori di trascrizione delle famiglie proteiche Fos e Jun, la sovraregolazione dell'espressione di specifiche subunità dei recettori della famiglia AMPA-glutammato, l'aumento della espressione dei geni codificanti per il CRF e per NO-sintetasi. Inoltre si sono osservate alterazioni dell'espressione dei geni codificanti per i precursori e i recettori oppioidi.

Gli oppioidi sono anche in grado di modulare diversi fattori di trascrizione come CREB, DARPP32, NF- κ B e membri della cascata delle MAPK.

CREB viene fosforilato dalla PKA sulla Ser133 e, così

attivato, trasloca nel nucleo dove regola la trascrizione di geni precoci. È stato dimostrato che la up-regulation di AC1 e AC8 nel locus coeruleus, in seguito a trattamento cronico con oppioidi, è dovuta a CREB; la fosforilazione di CREB è aumentata nelle corna dorsali del midollo spinale in topi tolleranti all'effetto analgesico della morfina; la fosforilazione di CREB è aumentata anche nel nucleus accumbens in animali dipendenti da morfina. CREB è soggetto a diversi fattori di regolazione, come PKA, la cascata delle MAPK, DARPP32, Ca^{2+} /calmodulina e PKC (Figura 41.5).

I recettori oppioidi sono capaci di stimolare anche tutte le vie delle MAPK. L'attivazione dei recettori μ , δ e κ attraverso il complesso $G_{\beta\gamma}$, e in modo Ras-dipendente, aumenta la fosforilazione di ERK1/2, sia in sistemi cellulari che in vivo (area tegmentale ventrale e locus coeruleus), portando all'attivazione di fattori di trascrizione del tipo Elk-1. In linee cellulari, l'attivazione dei classici recettori oppioidi, μ , δ e κ produce solo debole stimolazione di JNK, e regola l'attivazione di p38 MAPK via PKA e PKC. Infine, in aggiunta alle modificazioni dell'espressione genica provocate dal signalling oppioide, è da menzionare che a sua volta l'espressione dei geni per i differenti elementi del sistema oppioide risulta alterata in numerose condizioni patologiche, quali il Parkinson, l'epilessia o l'esposizione a differenti classi di farmaci d'abuso.

Meccanismi epigenetici

In anni recenti, la messa a punto di tecniche avanzate per lo studio del rimodellamento della cromatina ha permesso di indagare, anche per il sistema oppioide, i meccanismi epigenetici alla base delle modifiche dell'espressione genica che si verificano in seguito a esposizione cronica ad agonisti dei recettori oppioidi. Si è compreso che i geni che codificano per i recettori μ , κ e δ presentano differenti forme di regolazione epigenetica, suggerendo che questa modulazione può fornire l'indicazione principale della loro diversa specificità cellulare. Se fino a oggi gli studi sulla regolazione trascrizionale dei geni oppioidi hanno fornito informazioni utili ma non rilevanti dal punto di vista farmacologico, gli studi recenti di modulazione epigenetica hanno suggerito invece l'interazione di questo sistema con specifici stati o condizioni fisiologiche, ambientali e nutrizionali. Ad esempio, la divergenza dei meccanismi di regolazione del gene per il recettore κ rispetto al μ e al δ , nonché le differenze nelle funzioni fisiologiche osservate, hanno suggerito che questo recettore si è evoluto molto diversamente rispetto agli altri membri della famiglia oppioide.

Studi recenti indicano alterazioni di meccanismi epigenetici, quali la metilazione del DNA o l'acetilazione degli istoni, conseguenti al trattamento cronico con morfina. Inoltre, per quanto riguarda gli effetti di immunomodulazione da oppiacei mediati dal recettore μ , è stato osservato che l'IL4 induce l'espressione dei μ attraverso il fattore di trascrizione STAT6 fosforilato: l'effetto si verifica dopo pochi minuti, ma studi di immunoprecipitazione hanno permesso di evidenziare che dopo diverse ore si

verificano numerose modifiche epigenetiche che plasmano l'architettura del gene. Così, l'attivazione del gene per il recettore μ è stata associata a modificazioni istoniche (trimetilazione e acetilazione) nel suo promotore. Questo ha suggerito che modificazioni epigenetiche della cromatina del gene che codifica per il recettore μ siano coinvolte nella sua attivazione trascrizionale in risposta all'IL4 nei linfociti T.

Dipendenza psichica: oppioidi e sistema limbico

È noto che gli oppiacei possono sviluppare il fenomeno della dipendenza psichica, che può restare distinto dalla tolleranza e dalla dipendenza fisica.

La dipendenza psichica è un disordine cronicamente ricorrente caratterizzato da un comportamento compulsivo, cioè di perdita di controllo nei confronti della ricerca e dell'assunzione di sostanze di abuso, incurante dei danni procurati a se stessi e agli altri. Il termine inglese *addiction* deriva infatti dal latino *addicere* o rendere schiavo e indica un comportamento compulsivo, cioè incontrollato, nella ricerca di una situazione o di una condizione di gratificazione. Gli effetti di rinforzo di tutte le sostanze di abuso sono dovuti ad azioni sul sistema mesolimbico-corticale, un circuito costituito da neuroni a prevalente modulazione dopaminergica che proiettano principalmente dall'area ventrale tegmentale (VTA) alla *shell* del nucleo accumbens (NAc), all'amigdala, alla corteccia prefrontale (PFC). Il circuito comprende anche proiezioni glutamatergiche dalla PFC e dall'amigdala al NAc e proiezioni GABAergiche da quest'ultimo alla VTA. Interneuroni oppioidi sono presenti sia nell'NAc e nell'amigdala, sia nella VTA (Figura 41.6).

Le proprietà di rinforzo positivo di tutte le sostanze di abuso sono il risultato della attivazione delle proiezioni dopaminergiche mesolimbiche. Gli oppioidi endogeni e gli oppiacei facilitano la liberazione di dopamina direttamente attivando i recettori μ e δ nell'NAc e indi-

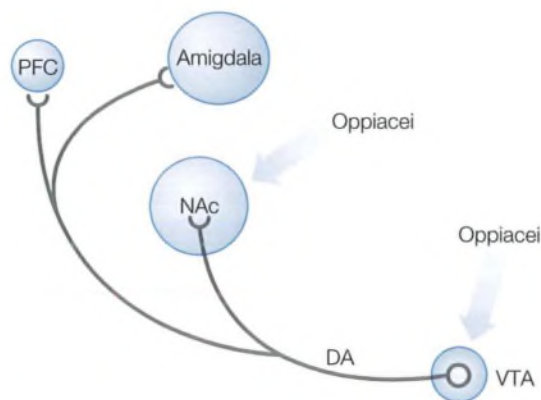


FIGURA 41.6 Schema del sistema mesolimbico-corticale. Neuroni di natura dopaminergica (DA) proiettano dall'area ventrale tegmentale (VTA) al nucleo accumbens (NAc), alla corteccia prefrontale (PFC) e all'amigdala.

rettamente attivando i recettori μ sui neuroni gabaergici della VTA; in questa sede infatti, inibendo la neurotrasmissione GABAergica, aumentano il firing dei neuroni dopaminergici.

Al contrario, l'attivazione dei recettori κ , indotta da oppioidi e da oppiacei, inibisce la trasmissione dopaminergica nel circuito mesolimbico-corticale: qui infatti i recettori κ sono localizzati sui corpi cellulari dei neuroni dopaminergici nella VTA e sulle terminazioni nel NAc. La liberazione di dopamina nell'NAc viene associata sia agli effetti della sostanza di abuso, sia al contesto ambientale in cui avviene la sua somministrazione. L'attenzione a questi eventi viene in tal modo esaltata e, al loro ripresentarsi, ne è facilitato il riconoscimento come segnali premonitori degli effetti del farmaco. Sebbene in condizioni fisiologiche siano spesso gli stimoli con finalità gratificanti ad attivare il rilascio di dopamina da questo circuito neuronale, non sembra che questo neurotrasmettitore produca di per sé effetti gratificanti o comunque piacevoli, come in precedenza si pensava, ma che piuttosto faciliti l'apprendimento delle esperienze associate al suo rilascio, indipendentemente dal loro contenuto affettivo. La dopamina potrebbe avere un ruolo anche nella durata della memoria a breve termine in questo contesto. Questa ipotesi potrebbe spiegare perché gli oppiacei e le altre sostanze di abuso producono *rinforzo* per esperienze sia a contenuti affettivi *positivi* (piacere, gratificazioni) sia a contenuti affettivi *negativi* (aversione) e possono funzionare come *stimoli discriminativi* in scelte operative (il soggetto sceglie ciò che in precedenza è stato accoppiato alla somministrazione del farmaco). Questa capacità degli oppioidi di funzionare da rinforzo e da stimolo discriminativo probabilmente rappresenta il principale incentivo all'*abuso* di questi farmaci.

È stato anche suggerito un coinvolgimento del sistema oppioide nei meccanismi molecolari che sottendono gli effetti di numerose sostanze d'abuso come cocaina, amfetamine e alcol, nonché una sua stretta interazione con altri sistemi neurotrasmettitoriali che partecipano a queste dinamiche, come ad esempio il sistema cannabinoide. Negli ultimi anni si è fatta strada l'ipotesi che almeno tre tipi di fattori diversi contribuiscano alla vulnerabilità di sviluppare una tossicodipendenza: fattori legati agli effetti della sostanza, fattori genetici e fattori ambientali (vedi **CD**:

Approfondimento 44.5 *La tossicodipendenza da oppiacei*). Dagli studi di farmacogenetica e dall'individuazione di polimorfismi genici nei cromosomi contenenti i geni che codificano per il sistema oppioide sono stati forniti punti di vista nuovi per aiutare a capire sempre più la dipendenza psichica. È stato proposto che almeno una percentuale variabile tra il 25 e il 60% dei fattori che determinano la vulnerabilità allo sviluppo di dipendenza psichica sia di tipo genetico, dipenda cioè dai polimorfismi genici, ad esempio per il recettore oppioide μ .

Un ruolo determinante è stato attribuito ai fattori di condizionamento ambientale.

È stato proposto che lo sviluppo della dipendenza psichica e la vulnerabilità nei confronti delle ricadute dopo privazione siano il risultato di processi neuroadattativi del SNC che si oppongono all'azione di rinforzo dei farmaci d'abuso.

In modelli animali di ricaduta (*relapse*), la lunga durata dell'efficacia degli stimoli associati a farmaci d'abuso, nel provocare il comportamento di ricerca compulsivo, rispecchia nell'uomo il perdurare della reattività agli stimoli condizionati e della ricerca del farmaco d'abuso indotta da stimoli. Questo conferma un ruolo significativo dei fattori di apprendimento e di condizionamento nel perdurare potenziale di dipendenza dei farmaci d'abuso. Un uso terapeutamente adeguato degli oppiacei per il trattamento del dolore cronico è stato ostacolato fino a oggi dall'errata convinzione che il loro utilizzo conducesse inevitabilmente alla condizione di dipendenza psichica. L'ipotesi ora prevalente suggerisce che l'uso terapeutico dell'oppiaceo non associ gli stimoli ambientali condizionanti così importanti nel determinare il rinforzo positivo che porta all'uso compulsivo. La condizione in cui si assume il farmaco, e soprattutto la sottostante patologia dolorosa, non forniscono il substrato e il contesto in cui la persona tende a ricercare la sostanza e le evidenze cliniche nel campo del dolore, in cui il fenomeno di abuso è osservato molto raramente, lo confermano.

Infine, recenti dati sperimentali indicano che in condizioni di dolore cronico si verificano fenomeni di desensitizzazione dei recettori μ in VTA con conseguente riduzione della liberazione di dopamina in NAc, fornendo così una base razionale della riduzione della gratificazione da oppiacei osservata in clinica.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Il sistema oppioide è un sistema endogeno di trasmissione, costituito da ligandi peptidici e loro specifici recettori, implicato nella neuromodulazione di diverse funzioni fisiologiche, tra le quali spiccano l'inibizione della trasmissione degli impulsi nocicettivi (attraverso meccanismi centrali e, secondo acquisizioni più recenti, anche periferici) e i meccanismi di gratificazione da sostanze d'abuso di differente natura.
- ▶ I recettori oppioidi (denominati μ , δ , κ e NOP) sono recettori di membrana prevalentemente accoppiati a proteine G di tipo inibitorio.
- ▶ Il sistema oppioide rappresenta il substrato fisiologico che rende possibili le azioni farmacologiche dell'alcaloide naturale morfina e dei suoi derivati (i farmaci oppiacei) e il loro impiego terapeutico nonché quello voluttuario.
- ▶ I peptidi oppioidi e i farmaci oppiacei deprimono la respirazione attraverso un effetto diretto sul centro respiratorio del tronco cerebrale; hanno effetti sulla motilità viscerale, sul sistema immunitario e sul sistema cardiovascolare.
- ▶ La tolleranza e la dipendenza fisica sono fenomeni farmacologici che si sviluppano in seguito all'esposizione cronica a oppiacei e sono determinate dal fenomeno della superattivazione dell'adenilato ciclasi e da altri importanti meccanismi di adattamento cellulare quali la desensitizzazione e l'internalizzazione dei recettori.
- ▶ Gli oppiacei possono sviluppare il fenomeno della dipendenza psichica (ricerca compulsiva del farmaco, perdurante desiderio di ripetizione dell'esperienza connessa alla sua assunzione), che può restare distinto, come sviluppo, durata e meccanismi, dalla tolleranza e dipendenza fisica.
- ▶ Il trattamento con oppiacei produce modificazioni dell'espressione genica di numerose proteine, neuromodulatori e mediatori in differenti tessuti e cellule, attraverso possibili meccanismi epigenetici.

Bibliografia essenziale

- ▶ Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels. 4th ed. Br J Pharmacol 2009;158:578-9.
- ▶ Alvarez V, Arttamangkul S, Williams JT. A RAVE about opioid withdrawal. Neuron 2001;32:761-3.
- ▶ Busch-Dienstfertig M, Stein C. Opioid receptors and opioid-producing leukocytes in inflammatory pain-Basic and therapeutic aspects. Brain Behav Immun 2010;24:683-94.
- ▶ Civelli O. The orphanin FQ/nociceptin (OFQ/N) system. Results Probl. Cell Differ 2008;46:1-25.
- ▶ Gutstein HB, Akil H. Opioid analgesics. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (eds). Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2006:547-90.
- ▶ Koch T, Holtt V. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. Pharmacol Ther 2008;117:199-206.
- ▶ Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY et al. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. Pharmacol Ther 2008;117:141-61.
- ▶ Trigo JM, Martin-Garcia E, Berrendero F et al. The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. Drug Alcohol Depend 2010;108:183-94.
- ▶ Van Rijn RM, Whistler JL, Waldhoer M. Opioid-receptor-heteromer-specific trafficking and pharmacology. Curr Opin Pharmacol 2010;10:73-9.
- ▶ Wei LN, Loh HH. Transcriptional and epigenetic regulation of opioid receptor genes-Present and Future. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2011;51:75-97.

Il sistema endocannabinoide

Daniela Parolaro, Tiziana Rubino

Obiettivi formativi

- Acquisire le conoscenze sull'organizzazione del sistema endocannabinoide in termini di recettori, ligandi endogeni e loro vie di sintesi e degradazione
- Comprendere il ruolo fisiopatologico del sistema endocannabinoide
- Acquisire conoscenze sulle varie classi di farmaci attivi sul sistema endocannabinoide e sul loro potenziale uso terapeutico

La scoperta avvenuta nel 1990 che uno dei recettori orfani derivati da una libreria di cDNA di cervello di ratto mediava gli effetti del Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC), il principale componente psicoattivo presente nella *Cannabis sativa*, è stata il punto di partenza per l'identificazione e la caratterizzazione di quello che oggi viene chiamato il sistema endocannabinoide. Infatti al clonaggio del recettore cerebrale CB1, è seguita l'identificazione di un secondo recettore chiamato CB2 e la scoperta che i tessuti di mammifero possono sintetizzare e rilasciare agonisti endogeni di questi recettori chiamati endocannabinoidi. L'intensa attività di ricerca sviluppatasi nell'ultimo decennio permette ora di affermare che il sistema endocannabinoide è implicato nella modulazione di numerose funzioni fisiologiche e patologiche non solo nel sistema nervoso centrale ma nell'intero organismo. Fanno parte del sistema endocannabinoide i recettori CB1 e CB2, gli endocannabinoidi, tra i quali i più conosciuti sono anandamide (AEA) e 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) e gli enzimi deputati alla loro sintesi e degradazione.

I recettori per i cannabinoidi

A oggi l'*International Union of Basic and Clinical Pharmacology* riconosce due tipi di recettori per i cannabinoidi, chiamati rispettivamente CB1 e CB2, in base all'ordine della loro scoperta, entrambi appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle G proteine. Il possibile inserimento in questa lista di un terzo recettore per i cannabinoidi, già conosciuto come recettore orfano GPR55, è a tutt'oggi oggetto di discussione. Infine diversi dati

sperimentali evidenziano la capacità degli endocannabinoidi di produrre effetti farmacologici per interazione con altre classi di recettori, in particolare i recettori per i vanilloidi TRPV1 e i recettori nucleari PPAR α e γ .

Recettori CB1

I recettori CB1 (CB1R) sono presenti in numerosi mammiferi, incluso l'uomo, e sono particolarmente abbondanti nel sistema nervoso centrale (SNC). Aree con una elevata densità di CB1R sono i gangli della base (substantia nigra, globo pallido, nucleo entopeduncolare e caudato-putamen laterale), il cervelletto, l'ippocampo e la corteccia. Sebbene in minor densità, i CB1R sono rilevabili anche in aree limbiche, quali l'accumbens e l'amigdala, nell'ipotalamo, nel mesencefalo, nel midollo allungato e nel midollo spinale (Figura 42.1). Discrete densità recettoriali sono state successivamente identificate anche in tessuti periferici quali il tessuto adiposo, il fegato, gli organi riproduttivi, il cuore, l'intestino, il tessuto vascolare e quello osseo. I CB1R possiedono la classica struttura dei recettori accoppiati alle G proteine e trasducono il segnale utilizzando G proteine di tipo inibitorio (G_i/o) che modulano diversi cammini intracellulari. In particolare l'attivazione dei CB1R provoca inibizione dell'adenilato ciclasi e dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, attivazione dei canali del potassio "inward rectifying", stimolazione della via delle MAP chinasi e liberazione dell'ossido nitrico. Nel sistema nervoso centrale i CB1R sono localizzati prevalentemente a livello presinaptico e la loro attivazione inibisce il rilascio dei neurotrasmettitori dalle terminazioni nervose. È ampiamente dimostrato che la maggior



FIGURA 42.1 Immagine autoradiografica della distribuzione dei recettori CB1 in sezioni sagittali di cervello di ratto. Aree con una elevata densità sono i gangli della base (substantia nigra, globo pallido, nucleo entopeduncolare e caudato-putamen laterale), il cervelletto, l'ippocampo e la corteccia. Cb: cervelletto; CPu: caudato-putamen; Ctx: corteccia cerebrale; EP: nucleo entopeduncolare; GP: globo pallido; Hi: ippocampo; SNR: sostanza nera reticolata

parte degli effetti dei cannabinoidi sul sistema nervoso centrale sono mediati dall'attivazione dei CB1R.

Recettori CB2

I recettori CB2 (CB2R) sono stati clonati alcuni anni più tardi e inizialmente si pensava fossero presenti solo nei tessuti periferici e in particolare nelle cellule del sistema immunitario e in tessuti quali la milza e il fegato. I CB2R sono localizzati anche a livello dell'endotelio polmonare, del tratto gastrointestinale, negli adipociti e nel tessuto cardiaco e osseo. Studi recenti, infine, dimostrano la presenza di CB2R nella microglia durante processi infiammatori e neurodegenerativi, mentre le evidenze di una loro espressione neuronale in alcune aree cerebrali sono ancora contraddittorie.

Il CB2R possiede un'omologia del 48% con il CB1R e, come il CB1R, è accoppiato a G α o proteine, ma conosce effettori solo parzialmente sovrapponibili a quelli del CB1. In particolare, i CB2R non modulano i canali ionici, mentre, come i CB1R, sono negativamente accoppiati all'adenilato ciclasi e sono in grado di attivare le MAP chinasi e di liberare ossido nitrico.

Recettore GPR55

Lavori recenti dimostrano che gli endocannabinoidi possono legare il recettore "orfano" associato alle G proteine chiamato GPR55, che viene prudentemente definito come recettore "atipico" per i cannabinoidi. Anche il GPR55 appartiene alla classe dei recettori accoppiati alle G proteine, è presente in numerosi organi e tessuti, incluso il cervello e ha un'omologia di sequenza con il CB1 inferiore al 20%. A differenza dei CB1R e CB2R, trasduce il segnale attraverso proteine Gq e G12/13, attivando la fosfolipasi C e la famiglia delle piccole GTPasi, come ad esempio RhoA. I classici antagonisti dei recettori CB1 e CB2 si comportano come agonisti nei confronti del GPR55, mentre l'agonista cannabico sintetico CP-55,940 agisce come antagonista/agonista parziale (vedi CD: Approfondimento 42.1. *Struttura dei farmaci attivi sul sistema endocannabinoide*).

Recettore TRPV1

Il recettore vanilloide (VR1), di recente ridefinito TRPV1 per la sua analogia con la famiglia dei canali ionici di tipo TRP (*Transient Receptor Potential*), è un canale non selettivo per cationi, di natura eccitatoria, altamente espresso nei neuroni primari delle fibre afferenti dove agisce come integratore molecolare degli stimoli nocicettivi (vedi CD: Approfondimento 22.7). TRPV1 è anche espresso in diverse aree cerebrali e talvolta è colocalizzato con il CB1R. TRPV1 può essere attivato da diversi stimoli, quali il calore, protoni e agonisti vanilloidi, così definiti per la presenza nella loro struttura di un nucleo vanillinico, come nel principio attivo del peperoncino, la capsaicina. Il ligando cannabinoide endogeno AEA, ma non il 2-AG, è in grado di legarsi a un sito citosolico di questo recettore provocando aumento del Ca²⁺ intracellulare. L'affinità dell'AEA per questo recettore è comunque inferiore a quella per i recettori CB1 e CB2.

Recettori PPAR

Dati recenti dimostrano che alcuni endocannabinoidi o i loro metaboliti sono in grado di attivare i recettori nucleari "proliferator-activated" dei perossisomi (PPAR) e in particolare i PPAR α e γ . Attraverso l'interazione con questi recettori nucleari gli endocannabinoidi sembrano regolare il metabolismo glucidico e lipidico, nonché le risposte infiammatorie.

Gli endocannabinoidi

La presenza di ligandi endogeni (endocannabinoidi) in grado di legare i recettori dei cannabinoidi è stata dimostrata subito dopo la caratterizzazione dei recettori. I primi ligandi endogeni identificati sono l'anandamide e l'arachidonoilglicerolo. Entrambi sono derivati dell'acido arachidonico e vengono prodotti da precursori fosfolipidici attraverso l'attivazione attività-dipendente di specifiche fosfolipasi. Successivamente sono stati identificati come endocannabinoidi anche la N-arachidonoil-dopamina (NADA), l'N-arachidonoil-glycerol-etero (noladin etere) e l'O-arachidonoil-etanolamina, chiamata anche virodamina. La farmacologia di questi ultimi composti è però ancora poco conosciuta. I ligandi endogeni non condividono gli stessi percorsi biosintetici o metabolici, a dimostrazione dell'esistenza di distinti meccanismi di regolazione sia per la formazione che per il catabolismo dell'AEA e del 2-AG.

Il sistema degli endocannabinoidi agisce in modo diverso dalla maggior parte dei sistemi di neurotrasmettitori. Più specificamente, gli endocannabinoidi vengono rilasciati "su richiesta" dalle cellule postsinaptiche, attraversano le sinapsi come messaggeri retrogradi e si legano ai CB1R espressi presinapticamente inibendo il rilascio dei neurotrasmettitori. Su tale base, il sistema endocannabinoide può essere considerato un importante modulatore dell'attività dei principali neurotrasmettitori e partecipa quindi alla regolazione della plasticità sinaptica.

Verranno qui di seguito analizzate le vie biosintetiche e degradative dei due composti endogeni meglio conosciuti, l'AEA e il 2AG.

Anandamide

Almeno 4 vie alternative possono produrre AEA dal precursore fosfolipidico di membrana N-arachidonoil-fosfatidil-etanolamina (NArPE); la più diretta (conversione diretta) viene catalizzata da una fosfodiesterasi selettiva per le N-acil-fosfatidiletanolamine (NAPE-PLD) in seguito a un rialzo dei livelli di calcio intracellulari e/o all'attivazione di particolari recettori (Figura 42.2). Altre vie biosintetiche sempre a partire da NArPE possono essere catalizzate da fosfolipasi C con produzione di fosfoAEA (convertita ad AEA da una fosfatasi), o, come evidenziato più recentemente, da una forma solubile di fosfolipasi A2 con produzione di 2-lisoNArPE convertita in AEA da una lisofosfolipasi D.

Dopo la sua ricaptazione, l'AEA viene idrolizzata dall'enzima amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH, un enzima legato alle membrane) con formazione di etanolamina e acido arachidonico (Figura 42.2). Esistono anche altre vie degradative, la cui rilevanza, però, a livello fisiologico è ancora discutibile. Ad esempio, in condizioni in cui l'attività della FAAH è soppressa, l'AEA diventa substrato per le ciclo ossigenasi 2 (COX2) con produzione dei corrispondenti derivati idroperossidi che vengono poi

convertiti in prostamidi. L'AEA lega sia il recettore CB1 che il CB2 e possiede un'affinità minore per il CB2 rispetto al CB1. L'AEA inoltre si comporta come agonista puro per i recettori vanilloidi TPVR1, ma anche in questo caso con un'affinità più bassa di quella per il recettore CB1.

2-arachidonilglicerolo (2-AG)

Sebbene inizialmente isolato da tessuti periferici, il 2-AG è soprattutto presente a livello del sistema nervoso centrale, dove si trova in concentrazioni molto più elevate di quelle dell'AEA. Quando utilizzato come endocannabinoide, il 2-AG viene prodotto quasi esclusivamente per idrolisi del diacilglicerolo (DAG) tramite una diacilglicerolo lipasi (DAGL) (Figura 42.2). Alternativamente, la fosfolipasi A1 (PLA1) può generare un lisofosfolipide che può essere idrolizzato a 2-AG da una liso-fosfolipasi C. A livello neuronale la biosintesi di 2-AG sembra essere attivata da elevati livelli intracellulari di calcio. Sebbene l'idrolisi del 2-AG possa essere catalizzata anche dalla FAAH, lo stesso enzima che degrada l'AEA, la via catabolica più importante è a carico di una monogliceride lipasi (MAGL), una serina idrolasi citosolica che converte i monogliceridi in acido grasso e glicerolo. Il 2-AG può essere metabolizzato anche da altre lipasi recentemente isolate quali l' $\alpha\beta$ idrolasi 6 (ABHD6) e ABHD12 (Figura 42.2). Come per l'AEA, in condizioni in cui l'attività della MAGL è soppressa, il 2-AG diventa substrato per le COX2

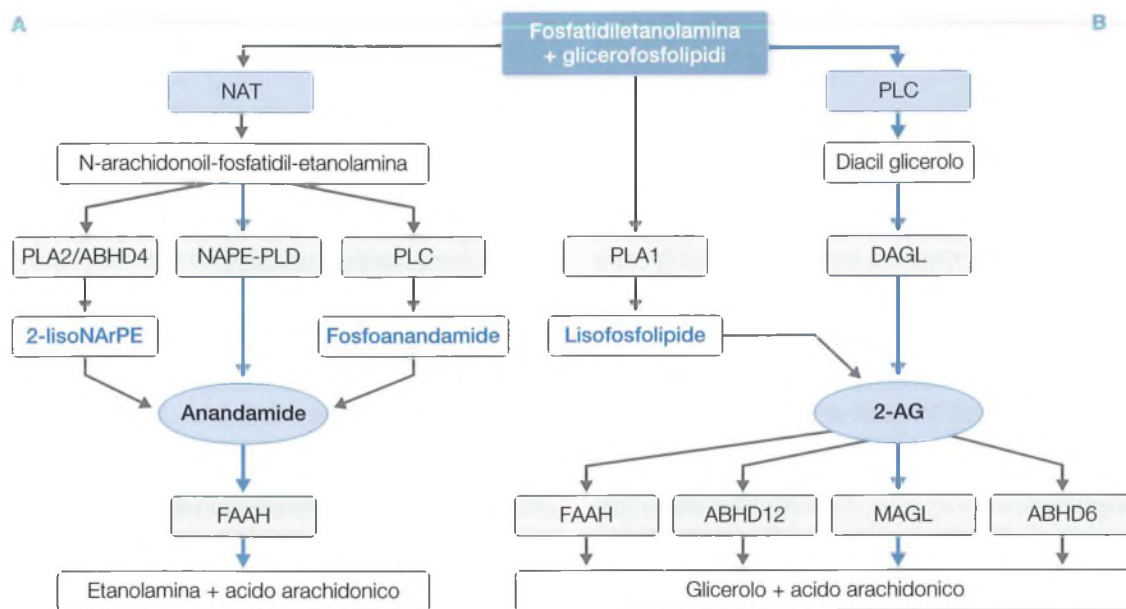


FIGURA 42.2 Principali vie di biosintesi e degradazione dell'anandamide (A) e del 2-arachidonil glicerolo (2-AG) (B). Esistono diverse vie per la sintesi e il catabolismo dell'anandamide e del 2-AG. L'anandamide origina da un precursore fosfolipidico, l'N-arachidonil-fosfatidil-etanolamina, che viene poi trasformata in anandamide attraverso quattro possibili vie alternative, la più diretta delle quali (conversione diretta) è catalizzata dalla NAPE-PLD. Il 2-AG, quando si comporta da endocannabinoide, viene prodotto quasi esclusivamente per idrolisi del diacilglicerolo attraverso specifiche diacilglicerolo lipasi. Dopo il loro reuptake cellulare, l'anandamide è metabolizzata da una amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH), mentre il 2-AG da una monoacilglicerolo lipasi (MAGL). Il 2-AG può essere metabolizzato anche da altre lipasi recentemente identificate, quali l'ABHD6 e ABHD12, così come dalla FAAH stessa.

NAPE-PLD: fosfodiesterasi selettiva per le N-acil-fosfatidiletanolamine; PLC: fosfolipasi C; PLA2: fosfolipasi A2; 2-liso NArPE: 2-liso N-arachidonil-fosfatidil-etanolamina; FAAH: amide idrolasi degli acidi grassi; DAGL: diacilglicerolo; PLA1: fosfolipasi A1; DAGL: diacilglicerolo lipasi; MAGL: monogliceride lipasi; ABHD4: $\alpha\beta$ idrolasi 4; ABHD6: $\alpha\beta$ idrolasi 6; ABHD12: $\alpha\beta$ idrolasi 12.

con produzione dei corrispondenti derivati idroperossidi che vengono poi convertiti in gliceril prostaglandine.

Il 2-AG lega sia i recettori CB1 che i CB2 con minore affinità dell'AEA ma maggiore efficacia, mentre non è in grado di attivare i recettori TPRL1.

Il trasportatore

Sebbene gli endocannabinoidi vengano prodotti "on demand" e rilasciati nell'ambiente extracellulare dove legano i recettori CB1 e CB2, la loro degradazione è un evento intracellulare. La natura lipofila degli endocannabinoidi suggerisce la possibilità che essi possano attraversare liberamente le membrane cellulari, ma numerose evidenze sperimentali depongono a favore della presenza di un meccanismo che facilita l'internalizzazione degli endocannabinoidi. L'esistenza di un trasportatore specifico per gli endocannabinoidi è ancora oggi materia di intenso dibattito. Sebbene il trasportatore per l'AEA non sia ancora stato clonato, la sua esistenza si basa sulla soddisfazione di quattro criteri essenziali per il trasporto mediato da carrier: la saturabilità, la velocità, la dipendenza dalla temperatura e la selettività del substrato.

Infine la lipofilia degli endocannabinoidi costituisce un ostacolo anche per il loro "trafficking" citosolico verso i siti di idrolisi (ad esempio, il reticolo endoplasmico per l'AEA). A tale proposito due proteine in grado di legare gli acidi grassi, le FAP 5 e 7, sono state recentemente isolate e identificate come carrier intracellulari dell'AEA almeno in sistemi di overespressione.

Funzioni biologiche del sistema degli endocannabinoidi

È ormai ampiamente documentato che i recettori CB1 e CB2 hanno una distribuzione molto più ampia di come si era inizialmente pensato e perciò l'idea iniziale che i CB1R svolgessero un ruolo solo nel SNC e i CB2 solo nel sistema immunitario si è evoluta nel concetto che entrambi i recettori possono modulare funzioni sia centrali che periferiche (Figura 42.3), quali ad esempio, lo sviluppo neuronale, la trasmissione sinaptica, l'infiammazione, il rilascio e l'attività degli ormoni, le funzioni cardiovascolari, respiratorie e riproduttive, il metabolismo energetico, la formazione dell'osso, così come funzioni cellulari quali la proliferazione, la motilità, l'adesione cellulare e l'apoptosi. Alterazioni nei livelli non solo dei recettori ma anche dei principali endocannabinoidi sono presenti in diverse condizioni fisiopatologiche a sottolineare la natura plastica di questo sistema.

Plasticità mediata dagli endocannabinoidi

Il ruolo del sistema endocannabinoide nei fenomeni di plasticità è particolarmente evidente nel SNC dove il sistema è coinvolto nelle risposte adattative allo stress cronico, nell'eccitotossicità e nella neuroinfiammazione, così come

in funzioni fisiologiche come la regolazione della forza di connessione sinaptica nei processi cognitivi, emotivi e affettivi e nelle loro alterazioni patologiche. Nel SNC gli endocannabinoidi sono sintetizzati durante periodi di intensa attività neuronale ed esercitano un meccanismo di feedback negativo poiché il rilascio postsinaptico di endocannabinoidi permette la loro interazione con i CB1R localizzati sui neuroni presinaptici che inibiscono la liberazione di neurotrasmettitori. La "plasticità mediata dagli endocannabinoidi" appare comune a numerose sinapsi del SNC e può sia attenuare che aumentare l'eccitazione, a seconda che il neurotrasmettitore di cui si inibisce il rilascio sia il glutammato o il GABA (Figura 42.4). Tra le varie forme di plasticità modulate dagli endocannabinoidi possiamo ricordare la DSI (*Depolarization Induced Suppression of Inhibition*) la DSE (*Depolarization Induced Suppression Of Excitation*) e l'LTD/LTP (*Long Term Depression/Potentiation*). La diversa localizzazione anatomica degli enzimi per la sintesi/degradazione dell'AEA (prevalentemente postsinaptici) e del 2-AG (postsinaptici/presinaptici) sembra favorire un ruolo prevalente per il 2-AG nei fenomeni di neuroplasticità. Gli enzimi per la biosintesi del 2-AG sono localizzati postsinapticamente nelle spine dendritiche in modo tale che il rilascio del 2-AG possa modulare l'attività del neurone presinaptico dove sono espressi i CB1R. L'azione modulatrice retrograda del 2-AG viene terminata dalla MAGL espressa nei neuroni presinaptici (Figura 42.4). Come ricordato precedentemente, la biosintesi, il rilascio e la degradazione sono eventi "on demand" e, grazie alla loro natura lipofila, gli endocannabinoidi hanno un effetto limitato nel tempo e nello spazio suggerendo una funzione paracrina.

Infine bisogna ricordare che in condizioni croniche le limitazioni nel tempo e nello spazio della trasmissione endocannabinoide potrebbero venir perse e che gli endocannabinoidi potrebbero agire per un tempo più lungo o su bersagli inizialmente non riconosciuti, contribuendo alla progressione delle patologie.

Altre funzioni biologiche

Un'analisi dettagliata delle funzioni biologiche regolate dagli endocannabinoidi e delle loro alterazioni patologiche, richiederebbe un ampio spazio e per ognuna di esse si rimanda alle review presenti in letteratura. Verranno qui analizzati solo alcuni esempi scelti in base alla promessa terapeutica che essi sembrano offrire. Infine per gli aspetti relativi all'abuso di *Cannabis*, vedi **CD**: Approfondimento 42.2. *Il sistema endocannabinoide nella dipendenza dalla Cannabis e da altre sostanze d'abuso.*

Disordini alimentari

Nonostante fosse nota da tempo la capacità della *Cannabis* di indurre appetito, soprattutto di cibo palatabile, solo recentemente si è giunti a una chiara dimostrazione del coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella regolazione dell'appetito, del comportamento alimentare e del peso corporeo. Studi condotti sia nei roditori che nell'uomo supportano l'ipotesi che gli endocannabinoidi

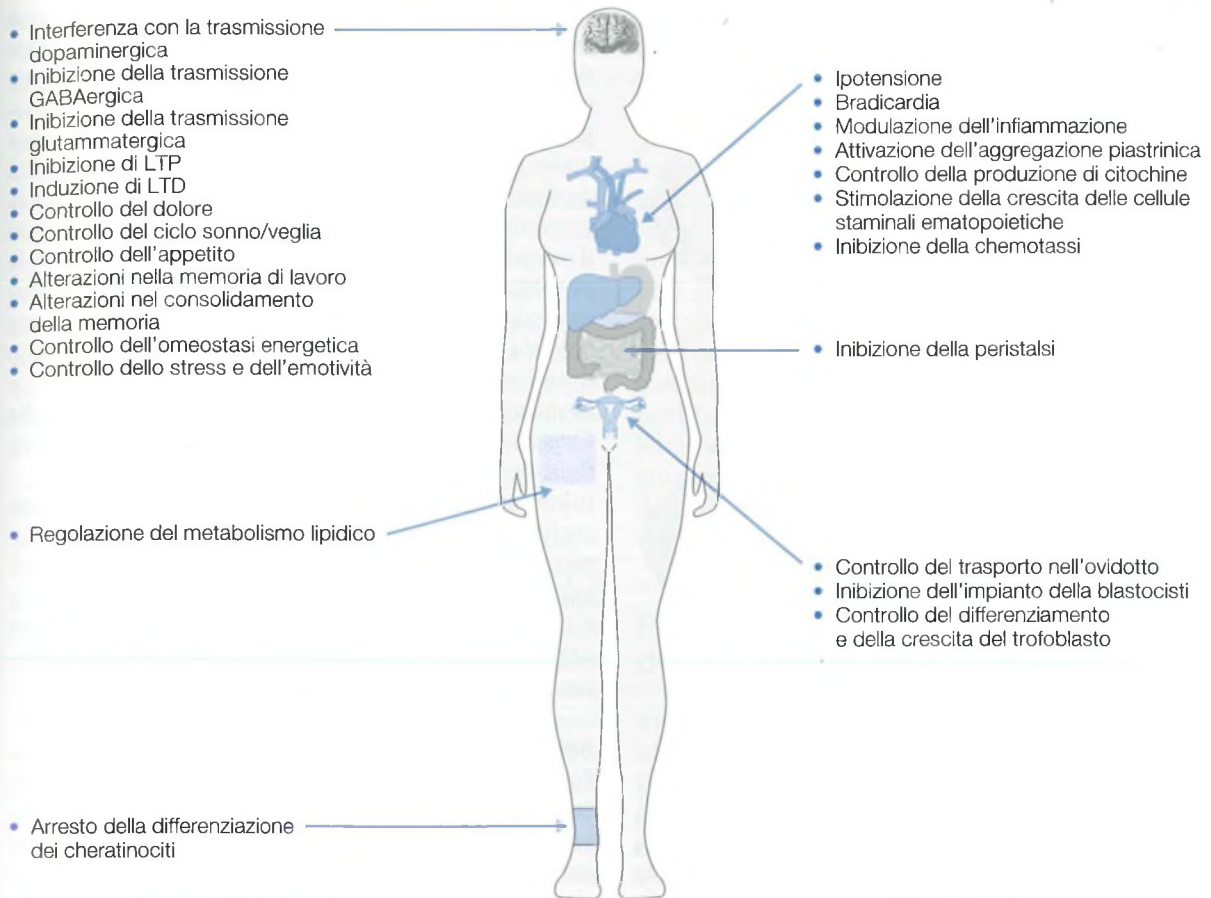


FIGURA 42.3 Funzioni biologiche mediate dal sistema endocannabinoide nel sistema nervoso centrale e negli organi periferici. (Da Maccarone et al. *Ann Rev Nutr* 2010;30:423-40, modificata)

di, attraverso l'attivazione dei recettori CB1 sia centrali che periferici, modulino il bilancio energetico a favore dell'immagazzinamento dell'energia, che nell'uomo consiste principalmente nell'incremento della produzione e dell'accumulo di lipidi.

A livello del SNC gli endocannabinoidi modulano l'assunzione di cibo per azione a livello dell'ipotalamo e del sistema limbico. Nell'ipotalamo gli endocannabinoidi, in modo particolare il 2-AG, riducono i segnali di sazietà e incrementano i segnali oressigeni. Nel sistema mesolimbico, notoriamente coinvolto nei meccanismi di reward, gli endocannabinoidi incrementano la motivazione verso il cibo, probabilmente rinforzandone il valore edonico e di incentivazione. A livello periferico l'attivazione di recettori CB1 presenti negli adipociti, nel fegato, nel pancreas e nel muscolo scheletrico promuove la lipogenesi, la secrezione di insulina e di glucagone e modula l'adiponectina, in altre parole partecipa alla modulazione del metabolismo.

Pazienti obesi o affetti da "binge eating" hanno elevati livelli plasmatici di endocannabinoidi, perciò la possibilità di utilizzare farmaci antagonisti in grado di ridurne gli effetti aveva aperto una nuova prospettiva terapeutica. L'antagonista del recettore CB1, SR141716A (rimonabant), aveva completato con successo la fase clinica III ed era

stato autorizzato in alcuni stati europei per la sua capacità di ridurre il peso corporeo, di migliorare le dislipidemie e di ridurre i livelli ematici di glucosio. La comparsa di significativi effetti avversi di natura centrale, quali gravi stati di ansia e depressione, ne hanno determinato il ritiro dal commercio. Attualmente sono in corso nuovi studi con composti CB1 antagonisti/agonisti inversi incapaci di passare la barriera ematoencefalica, CB1 antagonisti neutri, che potrebbero avere minori effetti collaterali, agonisti parziali del recettore CB1 e composti in grado di inibire la produzione di endocannabinoidi (bloccanti degli enzimi biosintetici).

Curiosamente elevati livelli plasmatici di endocannabinoidi sono rilevabili anche nei casi di anoressia nervosa creando un'apparente contraddizione con quanto osservato nei pazienti obesi. Un ipertono del sistema endocannabinoide è quindi presente in due situazioni patologiche opposte e la spiegazione più probabile è che l'innalzamento del segnale endogeno possa rappresentare sia un segnale adattativo per provocare il consumo di cibo, sia un meccanismo oressigeno alterato che partecipa all'iperfagia, all'accumulo di grasso e all'obesità.

L'utilizzo del THC (dronabinolo) nel deperimento da AIDS è uno delle poche indicazioni mediche ufficialmente approvate in USA per questa sostanza e molti studi

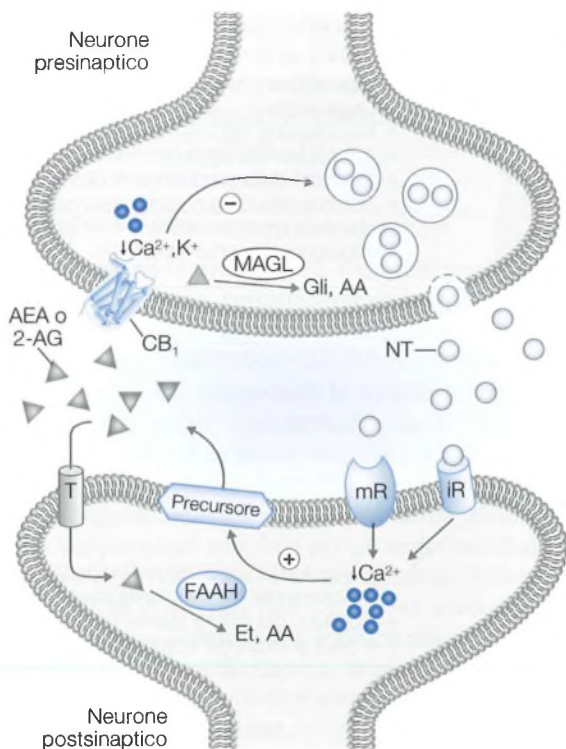


FIGURA 42.4 Neuromodulazione mediata dagli endocannabinoidi. I neuroni post-sinaptici, a seguito dell'incremento della concentrazione di calcio citosolico, producono endocannabinoidi a partire da precursori lipidici di membrana. Gli endocannabinoidi vengono rilasciati nello spazio sinaptico dove agiscono come messaggeri retrogradi legando i recettori CB1 presenti sui neuroni presinaptici. L'attivazione dei recettori CB1 presinaptici inibisce l'apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti e l'attivazione dei canali del K^+ , così inibendo il rilascio dei neurotrasmettitori (NT) quali il GABA e il glutammato. Il segnale viene spento tramite la ricaptazione intracellulare degli endocannabinoidi, effettuata da un ipotetico e non ancora identificato trasportatore, e dalla loro successiva degradazione a opera di specifici enzimi quali la FAAH e la MAG lipasi. iR: recettore canale; mR: recettore metabotropo. (Da: Guzman. *Nature Rev Cancer* 2003;3:745-55, modificata)

clinici confermano la sua utilità nei casi di anoressia nervosa e nella cachessia da cancro.

Dolore e infiammazione

La sensazione dolorifica è controllata da neurotrasmettitori che operano nel SNC, ma esiste anche un controllo periferico esercitato a livello delle fibre afferenti al di fuori del SNC. Il sistema endocannabinoide è fortemente implicato in questo controllo. Infatti la stimolazione farmacologica di recettori CB1 e CB2 periferici riduce il dolore e stimoli infiammatori e/o irritanti provocano un incremento nei livelli di endocannabinoidi nella pelle, nel midollo spinale e nei nervi periferici. Livelli elevati sono presenti anche nel dolore neuropatico e nelle dermatiti allergiche da contatto. Queste alterazioni potrebbero rappresentare una risposta adattativa per ridurre l'infiammazione e/o il dolore, come avvalorato dal fatto che gli inibitori della degradazione degli endocannabinoidi (ad esempio, URB597) hanno effetto analgesico e anti-

fiammatorio. La recente sintesi di un inibitore periferico della FAAH che non passa la barriera ematoencefalica (URB937) e che possiede un'ottima attività analgesica e antinfiammatoria nel dolore viscerale e in quello neuropatico, sembra indicare un roseo futuro terapeutico per queste molecole. Infatti a differenza degli effetti analgesici prodotti dalla stimolazione diretta dei CB1R cerebrali, la possibilità di ottenere un effetto analgesico intensificando il controllo della trasmissione dolorifica periferica offre la possibilità di sviluppare farmaci analgesici privi di effetti psicotropi. Un'altra possibilità per ottenere una buona risposta analgesica con limitati effetti psicotropi è quello di utilizzare il Sativex, un fitofarmaco contenente THC e cannabidiolo (un composto non psicoattivo presente nella *Cannabis sativa*) in rapporto 1:1 già autorizzato in diversi Paesi per il dolore neuropatico.

Infine non si può dimenticare che sono state rilevate anche riduzioni dei livelli di endocannabinoidi in diversi tessuti coinvolti nella trasmissione nocicettiva e gli antagonisti CB1 e CB2 sviluppano un effetto analgesico e antinfiammatorio. Nell'insieme queste contraddizioni suggeriscono che gli endocannabinoidi possono esercitare sia azioni pro- che antinfiammatorie.

Ansia e depressione

Poco si conosce sulla presenza di alterazioni nei livelli di endocannabinoidi in condizioni di ansia e/o di depressione anche se è ben dimostrato che il sistema si attiva nelle condizioni di stress cronico e di paura, situazioni che rispettivamente generano depressione e ansia. Diverse evidenze sperimentali sono a favore delle proprietà antidepressive sia degli agonisti CB1 che degli inibitori della degradazione dell'AEA. L'URB597 (inibitore della FAAH) e gli agonisti CB1, al pari dei più classici farmaci antidepressivi, incrementano la trasmissione serotonergica e noradrenergica e promuovono la neurogenesi. Gli inibitori della FAAH hanno un profilo migliore rispetto ai CB1 agonisti in quanto a concentrazioni crescenti generano una curva dose risposta sigmoidale, mentre i CB1 agonisti generano una curva a U rovesciata; gli inibitori della FAAH producono una lenta progressione temporale dell'incremento della trasmissione serotonergica, mentre i CB1 agonisti inducono un rapido incremento. Infine gli inibitori della FAAH, a differenza dei CB1 agonisti, non producono effetti gratificanti e/o di rinforzo.

Allo stato attuale delle conoscenze il ruolo del sistema endocannabinoide nel comportamento ansioso è ancora molto contraddittorio potendosi solo ipotizzare che lievi incrementi di AEA inducono un effetto ansiolitico dipendente dai CB1R, mentre consistenti incrementi provocano effetti ansiogenici che potrebbero dipendere dalla sua interazione con altri recettori quali il TRPV1.

Sistema immunitario

Gli endocannabinoidi sono in grado di modulare l'attività del sistema immunitario principalmente attraverso l'interazione con i CB2R. Le cellule immunitarie possono produrre endocannabinoidi e la risposta immunitaria può essere influenzata dalla somministrazione di cannabi-

noidi esogeni. La stimolazione dei recettori cannabinoidi delle cellule immunitarie inibisce l'attivazione cellulare, la produzione di citochine proinfiammatorie, l'apoptosi mediata da NF- κ B e modula le funzioni delle sottopopolazioni Th1 e Th2 dei linfociti T helper. I composti CB2 agonisti potrebbero quindi rendersi utili in quelle patologie dove è presente un eccesso di attivazione immunitaria, come ad esempio le malattie autoimmuni, in particolare quelle caratterizzate da un profilo Th1 quali la sclerosi multipla, l'artrite reumatoide, il diabete di tipo 1 (insulino-dipendente), la malattia di Crohn e la psoriasi. Il sistema endocannabinoide modula la risposta immunitaria anche nel sistema nervoso centrale dove la sua attivazione può costituire il confine tra neuroinfiammazione e neurodegenerazione.

Malattie neurodegenerative

Diversi dati aneddotici e scientifici riportano che i cannabinoidi possono alleviare alcuni sintomi delle più comuni malattie neurodegenerative quali il Parkinson (PD), l'Huntington (HD), l'Alzheimer (AD), la sclerosi multipla e la sclerosi laterale amiotrofica. Ciò implica che disregolazioni del sistema siano presenti in alcuni sintomi di queste patologie. Nell'HD e nell'AD così come nella sclerosi amiotrofica, la situazione infiammatoria provoca alterazioni sia nei livelli di endocannabinoidi che dei CB2R. L'attivazione dei CB2R da parte degli endocannabinoidi potrebbe avere un significato protettivo orientato a ridurre l'attivazione gliale. Tuttavia questo meccanismo compensatorio non è sufficiente a prevenire il processo infiammatorio che porta al danneggiamento/morte neuronale. La concomitante riduzione dei livelli di CB1R dimostrata nell'HD e nell'AD rende il neurone ancora più indifeso.

Nell'HD e nel PD sono stati ottenuti risultati contrastanti sia nei modelli sperimentali che nell'uomo utilizzando agonisti/antagonisti CB1 e CB2 e il fitocannabinoide non psicoattivo cannabidiolo, mentre nell'AD il THC sintetico (dronabinolo) è in grado di ridurre i disturbi comportamentali, la perdita di peso e l'agitazione notturna.

I risultati più promettenti riguardano invece la sclerosi multipla dove nei modelli sperimentali la somministrazione sia di agonisti diretti CB1 e/o CB2 che di modulatori del tono endogeno ha migliorato il quadro neurologico e, soprattutto nel caso degli agonisti indiretti, ha provocato una chiara attenuazione del processo infiammatorio e una stimolazione alla riparazione della guaina mielinica. Altrettanto positivi appaiono i risultati ottenuti nell'uomo con il farmaco Sativex (estratto di *Cannabis* contenente THC e cannabidiolo 1:1) somministrato per via sublinguale e ora autorizzato in diverse nazioni. Gli effetti più frequentemente dimostrati sono la riduzione della spasticità e del dolore e il miglioramento del sonno. Il farmaco è generalmente ben tollerato e non altera la memoria nemmeno dopo somministrazione ripetuta. Trial clinici condotti utilizzando THC sintetico (dronabinolo) o di estrazione (marinol) hanno dato gli stessi risultati per la riduzione del dolore ma sono meno efficaci nel controllo della spasticità e delle funzioni motorie.

Tumori

L'ipotesi di un ruolo protettivo degli endocannabinoidi nei confronti della crescita tumorale è sostenuta dalla capacità dei CB1 e CB2 agonisti di ridurre la carcinogenesi, la crescita e l'invasività di diversi tipi di tumori modulando processi quali la mitosi, l'apoptosi, l'angiogenesi, la migrazione delle cellule tumorali e la formazione di metastasi. Pur tuttavia esistono anche esempi a favore di un effetto pro proliferativo degli endocannabinoidi che però non sembra mediato dai recettori cannabinoidi e l'antagonista del CB1R SR141716A inibisce la crescita delle cellule del tumore della mammella in vitro con un meccanismo ancora da chiarire. Da ricordare i confortanti risultati iniziali ottenuti con la somministrazione intracraniale di THC in 9 pazienti affetti da glioma multiforme dove il trattamento non ha provocato segni di tossicità e, in due di essi, ha allungato il tempo di sopravvivenza.

Farmacologia del sistema degli endocannabinoidi

Parallelamente al rapido progredire delle conoscenze sul sistema degli endocannabinoidi si sono sviluppati farmaci in grado di legare i recettori CB1 e/o CB2 e di inibire i meccanismi di biosintesi e degradazione degli endocannabinoidi.

I farmaci attivi sul sistema degli endocannabinoidi possono essere divisi in due grandi categorie: la prima comprende i cosiddetti agonisti/antagonisti diretti dei recettori CB1 e CB2, mentre la seconda comprende farmaci in grado di aumentare il tono endogeno per inibizione degli enzimi che degradano l'AEA e/o il 2-AG (agonisti indiretti) e farmaci che invece riducono il tono endogeno per inibizione degli enzimi biosintetici.

Nella figura 42.5 viene riportata una schematica sintesi dei principali farmaci delle categorie sopra menzionate, mentre per le formule di struttura *vedi CD*: Approfondimento 42.1.

Agonisti diretti

Agonisti CB1/CB2

Appartengono alla categoria dei farmaci in grado di legare con simile affinità sia i recettori CB1 che i CB2, i cannabinoidi naturali Δ^9 -THC e Δ^8 -THC, i composti tricyclici sintetici definiti "non classical cannabinoid", come il composto CP-55,940, gli amminoalchilindoli sintetici come il WIN 55,212-2 e gli endocannabinoidi AEA e 2-AG. Molti degli agonisti CB1/CB2 (a eccezione della AEA) contengono dei centri chirali e possiedono una elevata stereoselettività (Figura 42.6).

Agonisti CB1 selettivi

La struttura dell'AEA ha rappresentato il punto di partenza per lo sviluppo di farmaci selettivi per il recettore CB1. I primi farmaci sintetizzati sono stati il composto O-1812 e la metanandamide dove un atomo di idroge-

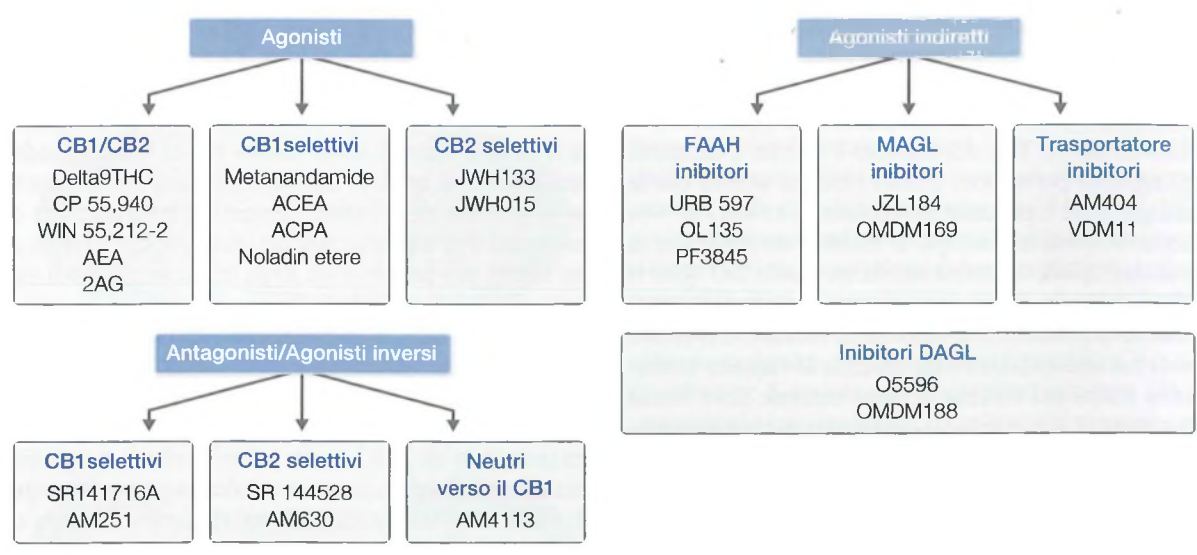


FIGURA 42.5 Classificazione schematica dei principali farmaci che modulano il sistema endocannabinoide. I composti agonisti con affinità sia per il recettore CB1 che per il CB2 includono sia i ligandi endogeni anandamide e 2-AG che gli agonisti esogeni quali il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), il principale componente psicoattivo della *Cannabis*, così come derivati sintetici quali il CP 55,940 e il WIN 55,212-2. La famiglia dei diarilpirazoli comprende antagonisti selettivi per il recettore CB1 (SR141716A e AM251) e per il recettore CB2 (SR144528, AM630) dotati di attività di agonista inverso. Al contrario il composto AM4113 si comporta da CB1 antagonista neutro. Il sistema endocannabinoide può essere modulato anche attraverso l'inibizione degli enzimi degradativi dell'anandamide e del 2-AG, quali rispettivamente i composti URB597 e JZL184, o attraverso l'inibizione del loro uptake cellulare (AM404). Di più recente sintesi sono le molecole in grado di inibire la sintesi del 2-AG (O5596 e OMDM188).

no sul carbonio 1 o 2 è stato sostituito con un gruppo metile. Questa sostituzione, oltre ad aumentare l'affinità per il CB1R, produce anche un altro importante effetto che è quello di rendere la molecola più resistente alla degradazione della FAAH. Altri composti CB1 selettivi sono l'ACEA (arachidonoil-2'-cloroetilamide) e l'ACPA (arachidonoilciclopropilamide), nessuno dei quali esibisce però una maggiore resistenza

alla degradazione enzimatica. Infine tra i derivati dell'acido arachidonico dobbiamo ricordare il noladin etere (2-arachidonoilgliceril etere), un membro della famiglia degli endocannabinoidi.

Agonisti CB2 selettivi

I più comuni farmaci CB2 selettivi appartengono alla famiglia dei cannabinoidi classici con struttura ammino

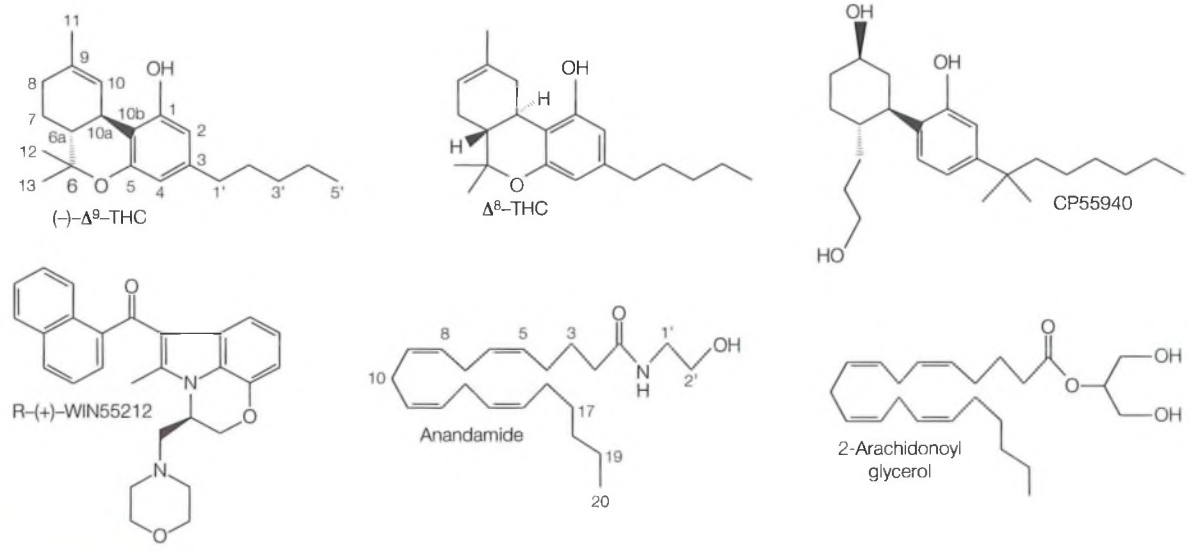


FIGURA 42.6 I composti che legano sia i recettori CB1 che i recettori CB2 appartengono a una delle seguenti quattro classi chimiche: cannabinoidi classici (Δ^9 -THC e Δ^8 -THC), cannabinoidi non classici (CP55940), amminoalchilindoli (WIN55212-2) ed eicosanoidi (anandamide e 2-arachidonoilglicerolo).

alchilindolica e i più noti rappresentanti sono i farmaci sintetizzati da John Huffman e cioè i composti JWH133 e JWH015. Altri farmaci CB2 selettivi sono il composto GW405833, HU308 e AM1241.

Antagonisti

Antagonisti CB1 selettivi/agonisti inversi

Il primo farmaco sviluppato come antagonista selettivo del recettore CB1 è il diarilpirazolo SR141716A, in grado di antagonizzare sia in vitro che in vivo gli effetti legati alla stimolazione del recettore CB1. Si sono poi sviluppate altre molecole come i composti AM251 e AM281. Convincenti evidenze sperimentali dimostrano che nessuna di queste molecole è un antagonista neutro ma nei tessuti contenenti i CB1R, oltre ad antagonizzare gli effetti prodotti dai CB1 agonisti, queste molecole sono in grado di provocare di per sé effetti farmacologici opposti a quelli prodotti dai CB1 agonisti. In alcuni casi questi effetti sono attribuibili all'antagonismo delle azioni degli endocannabinoidi, ma l'ipotesi più comunemente accettata è che questi farmaci siano agonisti inversi del CB1R, cioè inibiscano l'attività costitutiva del CB1R.

Antagonisti CB2 selettivi/agonisti inversi

I più noti antagonisti CB2 selettivi sono i composti SR144528 (diarilpirazolo) e AM630 (6-iodopravadolina). Entrambi i composti esibiscono una affinità molto più elevata per il CB2 rispetto al CB1, hanno notevole capacità di antagonizzare effetti CB2 selettivi e si comportano come agonisti inversi.

Antagonisti neutri

Un'intensa attività di ricerca è ora finalizzata alla sintesi di antagonisti neutri dei recettori CB1 e CB2. Un antagonista neutro offrirebbe l'indubbio vantaggio di permettere di distinguere tra gli effetti legati alla stimolazione del sistema endocannabinoide e quelli invece derivanti dall'attività costitutiva dei recettori. Il principale rappresentante di questa categoria è il composto CB1 antagonista AM4113.

Agonisti indiretti

La presenza di specifiche vie di sintesi e degradazione degli endocannabinoidi, nonché di un ipotetico trasportatore per la loro ricaptazione, ha permesso di sviluppare farmaci in grado di inibirne la degradazione e/o il reuptake e quindi di incrementare il tono endogeno.

Inibitori della degradazione degli endocannabinoidi FAAH inibitori

Esiste un'ampia disponibilità di farmaci in grado di inibire selettivamente l'attività della FAAH. Il composto URB597 è senz'altro il più utilizzato e deve il suo effetto inibitorio alla carbamilazione di una serina nucleofila della FAAH. Altri farmaci altamente selettivi sono il composto OL-135 e PF3845 (un derivato dell'urea). Tut-

ti questi farmaci inibiscono la FAAH a concentrazioni nanomolari e non legano i recettori dei cannabinoidi.

MAGL inibitori

Negli ultimi anni si sono fatti molti progressi anche nell'identificazione di farmaci in grado di inibire selettivamente la MAGL. Ad esempio, il composto OMDM169 è un inibitore competitivo che incrementa i livelli di 2-AG ma non dell'AEA sia in linee cellulari che in vivo; a causa della sua somiglianza strutturale con la tetraidrolipstatina, inibisce anche la DAGL α -pancreatica. Il più potente e selettivo inibitore della MAGL è il composto JZL184 che incrementa i livelli di 2-AG, ma non dell'AEA, nel sistema nervoso centrale e nei tessuti periferici inducendo effetti cannabimimetici. JZL184 possiede un eccellente profilo di selettività, non altera l'attività delle ABHD 6 e 12 e quindi è un ottimo strumento per studiare il ruolo della MAGL senza contaminazioni derivanti dall'attività idrolitica di altri enzimi.

Inibitori della ricaptazione dell'anandamide

Il primo inibitore della ricaptazione dell'AEA sintetizzato è stato il composto AM404, la cui selettività è però discutibile perché alle concentrazioni attive sul trasportatore inibisce la FAAH, lega i CB1R e attiva i recettori TPRV1. Anche altri inibitori ora disponibili come i composti VDM11, UCM707, OMDM-1 e 2 mantengono la capacità di inibire la FAAH e di legare i recettori CB1 e CB2. Resta pertanto poco chiaro se l'effetto di queste molecole sia dovuto all'inibizione dell'ipotetico trasportatore o piuttosto a una inibizione della FAAH che causa un accumulo di AEA intracellulare sufficiente a ridurre/annullare la diffusione dell'AEA dallo spazio intracellulare. Il più recente composto O-2093 è un inibitore covalente dotato di buona attività anche in vivo.

Inibitori della sintesi degli endocannabinoidi

Le uniche molecole finora disponibili sono gli inibitori della biosintesi del 2AG. I composti di prima generazione tetraidrolipstatina (THL) e RHC80267 inibiscono la DAGL nei neuroni e in linee cellulari in coltura senza influenzare l'attività della MAGL. Più selettivi e specifici sono i composti di seconda generazione O-5596 e OMDM188 che inibiscono la DAGL a concentrazioni nanomolari e senza influenzare né la NAPE-PLD, né la FAAH o la MAGL. Queste molecole potrebbero rappresentare un interessante mezzo farmacologico nelle situazioni patologiche associate a una over attività del sistema endocannabinoide e quindi potrebbero costituire un'utile alternativa all'utilizzo di antagonisti. Non va però dimenticato che il 2-AG e più in generale le N-aciletanolamine possono essere prodotti attraverso diverse vie metaboliche e molte tappe della loro biosintesi sono comuni ad altri lipidi bioattivi. Perciò l'inibizione della DAGL potrebbe non essere sufficiente a produrre una riduzione del livello del 2-AG ma, nel contempo, potrebbe indurre alterazioni nella composizione dei lipidi di membrana o nella produzione di altri lipidi bioattivi.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Il sistema endocannabinoide è un sistema di comunicazione cellulare con funzione omeostatica e pleiotropica, presente sia nel sistema nervoso centrale che in periferia. È costituito dai recettori CB1 e CB2, dai ligandi endogeni anandamide e 2-arachidonoilglicerolo e dagli enzimi deputati alla loro sintesi e degradazione.
- ▶ Gli endocannabinoidi nel sistema nervoso centrale sono rilasciati "on demand" e agiscono come messaggeri retrogradi modulando la plasticità neuronale.
- ▶ Alterazioni nel sistema endocannabinoide sono coinvolte in diverse situazioni patologiche: ansia e depressione, dolore, infiammazione, malattie neurodegenerative, disordini alimentari e tumori.
- ▶ I farmaci attivi sul sistema endocannabinoide possono essere suddivisi in agonisti diretti (naturali e sintetici, più o meno selettivi nei confronti dei recettori CB1 e CB2); antagonisti selettivi per i sottotipi recettoriali (spesso dotati di attività di agonista inverso); agonisti indiretti (in grado di aumentare i livelli di endocannabinoidi inibendone la degradazione o il reuptake); e inibitori della sintesi degli endocannabinoidi (per ora limitati al 2-arachidonoilglicerolo).
- ▶ I molteplici strumenti farmacologici che modulano il sistema endocannabinoide rappresentano una promettente prospettiva terapeutica, ma necessitano di ulteriori conferme cliniche.

Bibliografia essenziale

- ▶ Bosier B, Muccioli G, Hermans E, Lambert DM. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1-12.
- ▶ Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Gujjarro A et al. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci* 2010;13:1265-70.
- ▶ Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:438-55.
- ▶ Guindon G, Hohmann A. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009;8:403-21.
- ▶ Hill M, Hillard C, Bambico F et al. The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressant. *TIPS* 2009; 30:484-93.
- ▶ Katona I, Freund T. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 2008;14:923-30.
- ▶ Maccarrone M, Gasperi V, Catani M et al. The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. *Annu Rev Nutr* 2010;30:423-40.
- ▶ Muccioli G. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov Today* 2010;15:474-83.
- ▶ Scotter E, Abood M, Glass M. The endocannabinoid system as a target for the treatment of neurodegenerative disease. *Br J Pharmacol* 2010;160:480-98.
- ▶ Tanasescu R, Constantinescu C. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* 2010;215:588-97.

Farmacologia dell'ossido nitrico

Emilio Clementi, Giacinto Bagetta, Giuseppe Nisticò

Obiettivi formativi

- Acquisire le basi teoriche e pratiche per comprendere i meccanismi molecolari d'azione dell'ossido nitrico
- Acquisire nozioni di base su come l'interazione molecolare dell'ossido nitrico con i suoi recettori cellulari moduli la risposta cellulare a diversi stimoli fisiologici e patologici
- Comprendere come l'azione cellulare dell'ossido nitrico si estrinsechi in sistemi complessi di organo, tessuto e sistema per generare la risposta farmacologica nell'uomo
- Comprendere le basi della farmacodinamica e della farmacocinetica dei farmaci donatori di ossido nitrico utilizzati nella pratica clinica

L'ossido nitrico (NO, monossido d'azoto) è un radicale di azoto originariamente studiato per le sue proprietà tossiche come contaminante ambientale e del fumo di sigaretta; da oltre venti anni si è scoperto che in realtà è anche un importante mediatore fisiologico, cardine nella regolazione del tono vascolare e coinvolto nella regolazione di importanti funzioni biologiche anche al di fuori del sistema cardiovascolare, soprattutto nel sistema immunitario, nella trasmissione nervosa, nel metabolismo e nella funzionalità del muscolo scheletrico. La sua peculiarità di essere un gas lo rende particolarmente sfruttabile dai sistemi biologici per la comunicazione intercellulare. In questo capitolo verranno descritte le proprietà chimiche dell'NO che rendono ragione delle sue azioni biologiche, come la sua generazione avvenga in modo controllato e i suoi effetti a livello cellulare. Queste basi permetteranno successivamente una trattazione degli effetti sistemici e di organo dell'NO. Nonostante la farmacologia dell'NO sia ancora legata ai classici farmaci utilizzati nelle malattie cardiovascolari (essenzialmente sodio nitroprussiato e nitrati organici), saranno brevemente descritte le nuove potenzialità farmacologiche che si stanno attualmente aprendo grazie a farmaci donatori di NO innovativi (vedi **CD**: Approfondimento 43.1. Scoperta del ruolo biologico dell'ossido nitrico e brevi cenni storici).

Chimica dell'ossido nitrico

L'NO è un radicale libero di azoto presente in condizioni normali come inquinante atmosferico e nel fumo di

sigaretta. I radicali liberi sono specie chimiche in cui gli elettroni del livello energetico più esterno sono spaiati; essi tendono a reagire attivamente nei tessuti biologici determinando variazioni dello stato chimico-fisico delle molecole con cui vengono a contatto. L'NO è in uno stato intermedio di ossidazione per cui è in grado sia di ossidare che di ridurre i composti chimici con cui viene a contatto.

L'NO può interagire in diversi modi con la materia vivente, trasformandosi in composti più stabili che possono sia essere attivi a livello biologico che essere utili come indici biochimici della produzione di NO. Le molecole che possono reagire con NO sono elencate nella tabella 43.1. Tra le varie reazioni possibili di NO, quelle con due proteine contenenti ferro eme, la guanilato ciclasi e la citocromo c ossidasi, sono le più rilevanti dal punto di vista biologico perché mediano la stragrande maggioranza degli effetti fisiologici di NO. Altre reazioni significative

TABELLA 43.1 Gruppi o composti chimici con cui l'NO è in grado di interagire

Ossigeno
Anione superossido
Ozono
Ossiemoglobina e altre emoproteine
Composti solforati
Ammine
Tirosine
Gruppi tiolici

al confine tra patologia e fisiologia sono le interazioni con i tioli. Le interazioni con ammine, tirosine, anione superossido e gruppi solforati mediano essenzialmente effetti patologici. Per dettagli sulle interazioni, vedi CD: Approfondimento 43.2. *Interazioni dell'ossido nitrico con i componenti dell'organismo.*

Biosintesi dell'ossido nitrico

L'NO è generato dalle NO sintasi a partire dalla L-arginina

La biosintesi dell'NO nelle cellule endoteliali e in altri distretti dell'organismo avviene principalmente attraverso la trasformazione della L-arginina in L-citrullina operata da enzimi detti NO sintasi (NOS) (Figura 43.1). L'NO può essere generato anche per via non enzimatica per disproporzionazione dei nitriti o loro riduzione. Le condizioni perché tali reazioni chimiche avvengano si hanno tipicamente a pH acido: la generazione non enzimatica di NO può quindi essere rilevante in condizioni di danno tessutale in cui il pH si abbassi (ischemia). Analoghi della L-arginina o ornitina, quali la N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA), la L-nitroarginina (L-NA), la L-nitroarginina metilestere (L-NAME) o la L-imminoetil ornitina (L-NIO), agiscono da falsi substrati delle NOS e sono inibitori selettivi della produzione di NO (Tabella 43.2). Tali inibitori della NOS inducono un'importante



FIGURA 43.1 Rappresentazione schematica del metabolismo dell'arginina. La sintesi di NO avviene per trasformazione enzimatica della L-arginina operata dalla NOS con produzione finale di L-citrullina.

riduzione della produzione sia di NO che di L-citrullina. L'azione della L-NMMA può essere antagonizzata dalla L-arginina ma non dalla D-arginina. La biosintesi di NO avviene per passaggi successivi, catalizzati dalle NOS, che portano alla ossidazione del gruppo guanidinico della L-arginina in un processo che utilizza 5 elettroni, richiede come cofattori NADPH, FAD e FMN, e porta alla formazione stechiometrica di NO e di L-citrullina (Figura 43.2). La reazione enzimatica

TABELLA 43.2 Farmacologia della via metabolica L-arginina-NO*

Farmaci che potenziano la trasmissione nitrgica	1. Precursori	L-arginina, L-ornitina
	2. Farmaci che provocano il rilascio di NO	<p><i>Per aumento del Ca²⁺ intracellulare:</i></p> <p>a) agonisti di recettori accoppiati all'idrolisi dei polifosfoinositidi e alla generazione di IP₃ (recettori accoppiati a G proteine e recettori a tirosina chinasi)</p> <p>b) recettori-canale per il calcio (NMDA)</p> <p>c) calcio ionofori (ionomicina)</p> <p><i>Per stimolazione della NOS II:</i></p> <p>LPS, IL-1β, TNFα, IFN-γ, SDF-1, altre citochine e chemochine</p>
	3. Farmaci che liberano NO	<p><i>Spontaneamente in soluzione salina:</i></p> <p>sodio nitroprussiato, DETA-NONOato, GSNO, S-nitroso acetilpenicillamina (SNAP)</p> <p><i>Per degradazione enzimatica:</i></p> <p>nitriti organici (nitroglicerina, isosorbide mono- o dinitrato, molsidomina e altri nitrovasodilatatori)</p> <p>Donatori di NO associati ad altri farmaci, ad esempio naproxinod</p>
	4. Farmaci attivi sulla via cGMP-dipendente	<p>Inibitori delle fosfodiesterasi: sildenafil, tadalafil, vardenafil, alcune xantine fra cui la teofillina (prolungano l'emivita di cGMP)</p> <p>Attivatori della guanilato ciclasi: YC-1, cinaciguat, ataciguat, riociguat (attivano l'enzima in un sito diverso da NO)</p>
Farmaci che inibiscono la trasmissione nitrgica	1. Farmaci che inibiscono la NOS	<p>Composti non selettivi: farmaci basati su arginina metilata (L-NMMA; L-NA; L-NAME), aminoguanidina, L-NIO, 7 nitroindazolo, difenilene iodonio</p> <p>Composti selettivi: ARL17477 selettivo per NOS I vs NOS III (ma solo 5 volte più selettivo per NOS I vs NOS II); 1400 W, GW273629, GW274150 e AR-C102222, selettivi per NOS II</p>
	2. Farmaci che inibiscono l'attività della guanilato ciclasi	Inibitori dell'enzima: blu di metilene (non specifico), H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-α]quinoxalin-1-one (ODQ, più selettivo)
	3. Farmaci che inibiscono la G chinasi	Analoghi modificati del cGMP (RP-compounds), KT5823

* Sono elencati sia i composti utilizzati nella ricerca di base, sia quelli in sviluppo preclinico e clinico o approvati come farmaci. Le proprietà di questi ultimi e dei composti in fase di sviluppo più promettenti sono dettagliate nel testo.

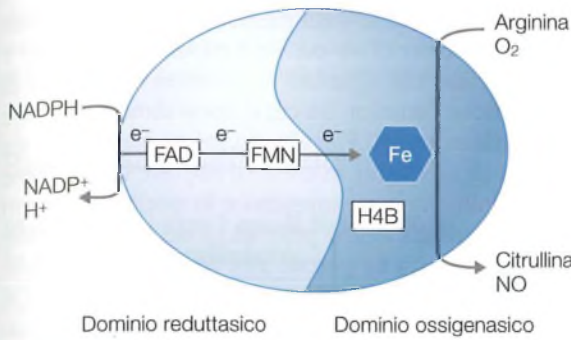


FIGURA 43.2 Rappresentazione schematica della reazione e dei cofattori implicati nella generazione di NO da parte delle NOS. Gli elettroni (e^-) sono donati dall' $NADPH$ al dominio reduttasico, e giungono al dominio ossigenasico attraverso il passaggio intermedio sui cofattori FAD e FMN . Gli elettroni interagiscono con ferro-eme e $H4B$, catalizzando l'ossidazione della L-arginina da parte dell'ossigeno, generando quindi NO e L-citrullina.

è molto complessa e non ancora del tutto chiarita nei dettagli. Il primo passaggio consiste nella trasformazione della L-arginina in idrossi-arginina. La idrossiarginina interagirebbe quindi con H_2O_2 sviluppata per opera dell'attività catalasica propria di una porzione della NOS. A tale reazione seguirebbe la formazione di un ulteriore substrato intermedio che, infine, verrebbe convertito in L-citrullina liberando NO . Ne deriva che la NOS è un complesso di attività enzimatiche, intimamente connesse fra loro, che consistono in una monoossigenasi tetraidropterina-dipendente, una diidropteridina reduttasi $NADPH$ -dipendente e una $NADPH$ ossidasi.

Le NOS costituiscono una famiglia di enzimi con proprietà distinte

La NOS è stata purificata da diversi tessuti di mammifero. A oggi sono state identificate tre isoforme dell'enzima: neuronale (NOS I) inducibile (NOS II) ed endoteliale

(NOS III). La loro struttura è rappresentata in modo schematico nella figura 43.3. Come molti altri enzimi cellulari, anche le NOS si sono evolute per funzionare in forma oligomerica: in particolare funzionano solo se associate in omodimeri.

Originariamente, le NOS venivano catalogate in funzione del tessuto/organo di identificazione. Tuttavia è subito emerso che la diffusione delle NOS nell'organismo è molto vasta, e che una forma identificata in un tessuto può essere espressa anche da altri. Per questo motivo oggi si preferisce utilizzare la nomenclatura con numeri romani. La NOS I è presente nei neuroni del sistema nervoso centrale e periferico, negli astrociti, nelle cellule neurosecernenti, nel muscolo scheletrico, nelle isole pancreatiche, nell'epitelio gastrico e polmonare, nelle cellule della macula densa renale. La NOS II è tipicamente presente nelle cellule dello stipite monocito-macrofagico ovunque esse si trovino, inclusa la microglia, e negli astrociti. La sua espressione può essere però indotta in tutte le cellule attivabili da citochine e prodotti di derivazione batterica, tra cui l'endotelio, il muscolo liscio e quello cardiaco, i cheratinociti, gli epatociti, i mastociti. La NOS III è stata localizzata inizialmente nell'endotelio, nel sistema nervoso e nell'epitelio renale, ma, recentemente, si è scoperto che essa ha una localizzazione ben più vasta, ed è stata trovata nei miociti cardiaci, nei linfociti T e B, in epatociti e in molte linee cellulari.

Un'importante caratteristica che differenzia le NOS I e III dalla II è la dipendenza dal Ca^{2+} . Infatti i primi due enzimi sono regolati dalle variazioni della concentrazione di Ca^{2+} citosolico, mentre la NOS II genera NO in modo indipendente da quest'ultima. In realtà tutte e tre le NOS legano il complesso Ca^{2+} -calmodulina e possono funzionare solo in presenza di tale complesso. Nel caso delle NOS I e III, la formazione del complesso con la Ca^{2+} -calmodulina è direttamente dipendente dall'aumento della $[Ca^{2+}]_i$; quando questa ritorna ai valori basali, il complesso si dissocia e l'enzima ritorna

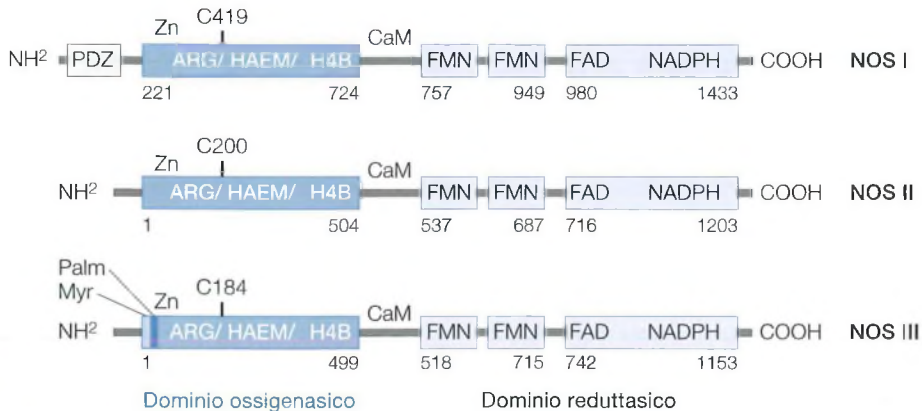


FIGURA 43.3 Rappresentazione schematica della struttura delle tre isoforme della NOS. Sono indicati i due principali domini, quello ossigenasico, contenente il gruppo prostetico eme (HAEM), e quello reduttasico. Si noti come tutte le forme presentino dei siti di legame per i cofattori $NADPH$, FAD , FMN e calmodulina (CaM), nonché per la tetraidropterina ($H4B$) e la L-arginina (ARG). Inoltre, la NOS III presenta un sito di miristilazione (Myr) e uno di palmitoilazione ($Palm$) che ne consentono l'ancoraggio alle membrane intracellulari. La NOS I presenta al suo sito N-terminale sequenze consenso, denominate PDZ , che facilitano l'interazione di questo enzima con altre proteine di membrana. (Per gentile concessione del Dr. R. Knowles, GlaxoSmithKline Research Centre, Stevenage, UK)

inattivo. Piccole differenze nel sito di legame per la Ca^{2+} -calmodulina sulla NOS II rendono il complesso NOS II/ Ca^{2+} -calmodulina virtualmente inscindibile anche a basse concentrazioni del catione. Questa differenza di modulazione tra le NOS è molto importante: le NOS I e III generano NO in modo regolato, non continuo e a concentrazioni nanomolari, mentre la NOS II genera NO in modo continuo nel tempo e a concentrazioni che spesso raggiungono il micromolare. Pertanto, nelle cellule che esprimono tale isoforma, l'attività enzimatica totale dipende fondamentalmente dal numero di molecole di enzima che sono presenti.

Accanto alla regolazione Ca^{2+} -dipendente, sono emerse negli anni regolazioni dell'attività enzimatica delle NOS mediate da fosforilazioni e interazioni proteina-proteina. Per la descrizione dettagliata di queste regolazioni, vedi **CD**: Approfondimento 43.3. *Attività catalitica, caratteristiche molecolari e regolazione delle NO sintasi*. Qui sono sottolineate solo le informazioni essenziali per comprendere come le diversità molecolari delle NOS rendano ragione del loro diverso ruolo biologico.

La NOS I ha la caratteristica unica tra le NOS di poter interagire in modo stabile con due proteine di membrana, la distrofina nel muscolo scheletrico e la proteina PSD95, costituente delle densità postsinaptiche. L'interazione con queste due proteine permette alla NOS I di essere mantenuta in localizzazioni strategiche sotto la membrana plasmatica dei neuroni e delle miofibre. Nel caso del tessuto nervoso la localizzazione nelle postsinapsi permette alla NOS di "sentire" le variazioni di ingresso di Ca^{2+} alla membrana plasmatica e di modulare la trasmissione sinaptica (vedi oltre). Similmente, la localizzazione alla membrana plasmatica delle miofibre, permette alla NOS I di generare NO in risposta alla attività contrattile muscolare facilitando la vasodilatazione e la espressione del trasportatore GLUT4 del glucosio, eventi che permettono di accoppiare l'accresciuta domanda di energia del muscolo in attività con una maggiore fornitura di energia stessa. La NOS III è caratterizzata dalla presenza di sequenze consenso per la miristilazione e la palmitoilazione, che favoriscono l'associazione dell'enzima con le membrane cellulari in modo dinamico e reversibile permettendo una localizzazione dell'enzima non solo alla membrana plasmatica, ma anche al complesso di Golgi e ai mitocondri. L'altro aspetto caratteristico della NOS III è la sua attivabilità non solo da parte di aumenti di Ca^{2+} citosolico, ma anche da fosforilazioni mediate dalla proteina chinasi B, o Akt, la cui attivazione è a sua volta dipendente dalla stimolazione della fosfatidilinositolo 3' chinasi (PI3K). Questa via di attivazione è utilizzata da stimoli quali i fattori di crescita, le citochine, e gli stimoli chemiotattici, e rende ragione del ruolo importante che la NOS III svolge nel trofismo dei tessuti in cui è espressa, primi fra tutti i tessuti cardiovascolare e muscolare.

Una differenza importante tra le isoforme I e III rispetto alla isoforma II è data dalla regolazione della loro espressione. Le NOS I e III sono espresse a livelli basali nelle cellule; la NOS II è invece assente e la sua espressione viene indotta a livello trascrizionale da stimoli specifici,

costituiti da citochine quali interferon γ (IFN- γ), tumour necrosis factor α (TNF- α), interleuchina 1β (IL- 1β) e altre citochine che agiscono in presenza di prodotti di degradazione batterica, tra cui il lipoarabinomannano e il lipopolisaccaride (LPS). Questo spiega perché essa sia espressa elettivamente in corso di risposte immunitarie nelle cellule immunocompetenti e in quelle esprimenti recettori per citochine e prodotti di degrado batterico. Questa differenza ha portato alla definizione di "costitutive" per le NOS I e III e di "inducibile" per la NOS II. Tuttavia, anche l'espressione delle NOS I e III può essere modulata pur se in modo più contenuto (vedi **CD**: Approfondimento 43.3).

L'NO regola la propria generazione da parte delle NOS

Il sistema di trasduzione del segnale attivato dall'NO si è evoluto per "sentire" la concentrazione di NO intracellulare e controllare così in modo stretto la generazione di NO. Nel caso della NOS II, il controllo da parte dell'NO si esercita sulla sintesi dell'enzima. L'NO, infatti, è in grado di legarsi al fattore inibitorio citosolico di NF- κ B, I- κ B, stabilizzando il complesso I- κ B/NF- κ B. Questo evento impedisce la traslocazione di NF- κ B al nucleo e la conseguente stimolazione della trascrizione del gene della NOS II. NF- κ B è un fattore trascrizionale comune a molti geni, quindi l'effetto inibitorio dell'NO non si esercita solo sulla neosintesi di NOS II, ma può avere valenza più ampia nel modulare la trascrizione genica cellulare. Il significato biologico di tale effetto dell'NO è tuttavia ancora non definito.

L'NO è anche in grado di legarsi alle tre NOS e di regolarne direttamente l'attività enzimatica in senso inibitorio. Non è ancora chiaro se ciò è da attribuirsi esclusivamente a un legame dell'NO direttamente al gruppo eme delle NOS e/o anche al legame a tioli critici o ad altri amminocidi situati sulle catene laterali dell'enzima.

La sintesi di NO è regolata da parte di L-arginina

La disponibilità di L-arginina è uno dei fattori che regolano la generazione di NO in senso sia positivo che negativo. Le due NOS costitutive sono relativamente insensibili a questa regolazione, poiché generano NO a basse concentrazioni e dopo stimolo con secondi messaggeri. Al contrario, la produzione prolungata di concentrazioni elevate di NO da parte di NOS II è sensibile alla regolazione da L-arginina. Molte delle citochine che regolano l'espressione di questo enzima regolano anche la disponibilità di L-arginina. LPS e IFN- γ , ad esempio, sono in grado di stimolare l'espressione dei trasportatori degli amminocidi cationici specifici per questo amminocido (CAT1, CAT2A, CAT2B e CAT3). Inoltre questi stimoli possono aumentare l'attività della argininosuccinato sintetasi (Figura 43.1), facilitando così la rigenerazione del pool intracellulare di L-arginina. Esiste tuttavia una regolazione negativa, in quanto molte citochine possono anche aumentare l'espressione della argininasasi costitutiva e indurre l'espressione di una isoforma inducibile di questo enzima (argininasasi II). La prevalenza di uno o

dell'altro sistema di regolazione (positiva oppure negativa) dipende dalle specifiche condizioni biologiche in cui si ha l'attivazione del sistema di sintesi dell'NO.

Biochimica dell'ossido nitrico

Meccanismi con i quali NO esplica la sua azione cellulare

Come accennato in precedenza, la generazione di NO da parte delle NOS avviene essenzialmente secondo due modalità: le NOS costitutive generano NO a concentrazioni nanomolari e per tempi limitati (minuti); la NOS II può invece generare NO a concentrazioni micromolari e per tempi prolungati. Questo aspetto è fondamentale per capire quali, tra le reazioni chimiche descritte in precedenza, possano essere rilevanti nel mediare gli effetti biologici di NO.

A concentrazioni nanomolari NO agisce con certezza su due bersagli intracellulari: la guanilato ciclasi citosolica, che viene attivata, e la citocromo c ossidasi, che viene inibita

Questi due enzimi mediano quindi l'azione fisiologica dell'NO. Esistono a tuttavia alcune condizioni particolari in cui NO a concentrazioni nanomolari può indurre nitrosazione di proteine e modificarne la funzionalità. Diversi studi hanno dimostrato che l'effetto biologico finale di NO risulta sovente dalla combinazione di eventi mediati dalla concomitante attivazione della guanilato ciclasi, inibizione della citocromo c ossidasi ed eventi nitrosativi. Un esempio chiaro sotto questo profilo è il controllo della morte cellulare da parte di NO (vedi **CD**: Approfondimento 43.4. *Ossido nitrico e controllo della morte cellulare*).

Delle altre reazioni chimiche che vedono coinvolto NO, nessuna svolge un ruolo rilevante nel mediare risposte fisiologiche. In particolare sia la deaminazione del DNA che la formazione di nitrotirosine avvengono in condizioni estreme (profonda ossidazione cellulare, presenza di alte concentrazioni di specie reattive dell'ossigeno e dell'NO). La loro comparsa non ha significato né fisiologico né di regolazione di risposte patologiche: è piuttosto indice di danno cellulare aspecifico e terminale. L'unica eccezione a oggi nota è la nitratura della prostaciclina sintasi, per via della localizzazione termodinamicamente favorevole della tirosina bersaglio di perossinitrito ($^-\text{OONO}$). La nitratura inibisce l'attività dell'enzima, con inibizione della sintesi di prostaciclina, un evento che contribuisce alla vasocostrizione indotta da agenti proinfiammatori quali LPS (vedi Capitolo 41).

NO attiva la guanilato ciclasi

La guanilato ciclasi, un enzima localizzato sia nel citosol che sulla faccia interna della membrana cellulare, è un eterodimero formato da una subunità α e una β . Esistono due isoforme di ciascuna subunità che generano enzimi diversi in termini di attività. La generazione di GMP 3'5'-ciclico (cGMP) porta alla attivazione di una serie di

proteine cGMP-dipendenti tra cui chinasi, fosfodiesterasi e alcuni canali di membrana. La stimolazione delle proteinchinasi cGMP-dipendenti (G chinasi) è importante nel controllo dell'omeostasi del Ca^{2+} : la G chinasi infatti inibisce l'attività delle fosfolipasi C β e γ , fosforila e quindi inibisce il recettore per l' IP_3 , inibisce l'ingresso di Ca^{2+} dai canali SMOE e VOCC e stimola l'estrusione del catione dal citosol attivando lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e le Ca^{2+} -ATPasi del reticolo e della membrana plasmatica. Il suo ruolo è quindi di modulare negativamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (vedi Capitolo 10). La G chinasi quindi è un attore importante che permette un controllo a "feedback" negativo tra i sistemi dell'NO e del Ca^{2+} : la generazione di NO, stimolata dall'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$, limita a sua volta questo aumento.

L'interazione NO/ Ca^{2+} è molto importante nella regolazione fine del tono vascolare e del metabolismo degli sfingolipidi

L'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stimola l'attivazione della chinasi della catena leggera della miosina, inducendo contrazione del muscolo liscio vascolare. A questo sistema di stimolazione si contrappone in parallelo quello attivato dall'NO: l'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ indotto da agonisti vasocostrittori stimola la produzione di NO da parte della NOS III nelle cellule endoteliali. L'NO diffonde alle cellule muscolari lisce sottostanti ove attiva la guanilato ciclasi e quindi la G chinasi. Il conseguente calo della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ porta a inibizione della contrazione del muscolo liscio e quindi a vasodilatazione. L'effetto vasodilatante è anche dovuto, in parte, ad azioni della G chinasi su bersagli non direttamente coinvolti nella regolazione dell'omeostasi del calcio. Tra queste azioni vi sono la stimolazione dei canali al K^+ attivati dal Ca^{2+} e la fosforilazione attivante della fosfatasi della catena leggera della miosina (Figura 43.4). Un altro sistema interessante di interazione biunivoca tra NO/G chinasi e un sistema trasducente cellulare è il controllo del metabolismo degli sfingolipidi. L'idrolisi della sfingomielina da parte delle sfingomielinasi porta a generazione di ceramide che poi viene metabolizzata a sfingosina 1 fosfato. Quest'ultima, agendo sui propri recettori specifici accoppiati a proteine G etero trimetriche, i recettori S1P (S1P_1 - S1P_5), induce sia aumenti di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ che attivazione della via PI3K/Akt con stimolazione delle NOS costitutive I e III (vedi sopra). L'NO così generato inibisce in modo G chinasi dipendente l'attività delle sfingomielinasi, generando quindi un loop di controllo a feedback negativo, che ha un ruolo rilevante nel controllare l'attività degli sfingolipidi e dell'NO nella maturazione delle cellule presentanti l'antigene, nell'angiogenesi e nella migrazione e chemiotassi.

Gli effetti del sistema NO/G chinasi su altre vie intracellulari sono molteplici e ancora in via di identificazione ed è impossibile descriverli tutti. A titolo di esempio si riportano quelli biologicamente più rilevanti. È stato dimostrato che il sistema NO/G chinasi modula la funzione di alcune proteine strutturali del citoscheletro, quali vimentina, desmina, connesine e calponina, attraverso l'attivazione di fosfoproteine e della proteinfosfatasi 2A. Inoltre, il

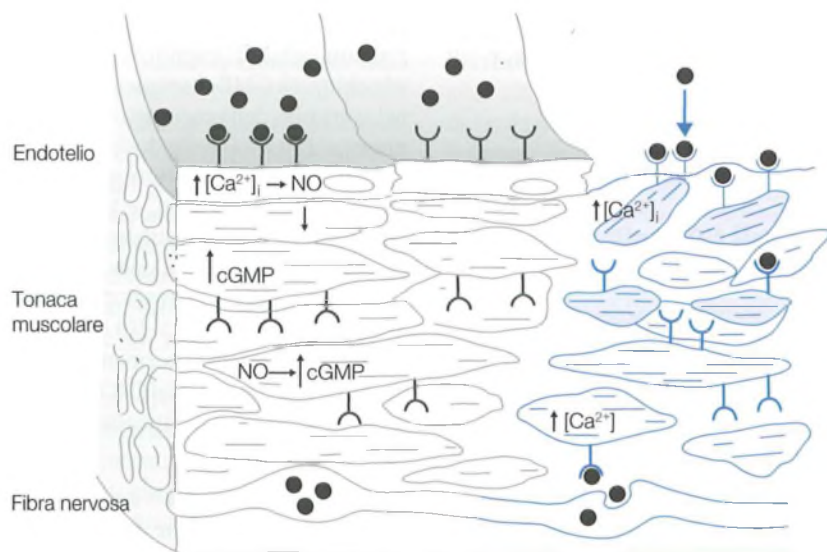


FIGURA 43.4 Lo stesso trasmettitore capace di indurre un aumento della $[Ca^{2+}]_i$ può indurre vasodilatazione o vasocostrizione a seconda della sede in cui è rilasciato e dalla presenza o meno di cellule endoteliali. Se un trasmettitore, come ad esempio la bradichinina (pallini neri), è presente nel sangue, esso attiva i recettori delle cellule endoteliali (parte in bianco e nero della figura). L'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ in queste cellule attiva la NOS: l'NO diffonde nelle cellule muscolari lisce dove, aumentando la concentrazione intracellulare di cGMP, induce rilassamento. Se il trasmettitore è rilasciato da terminali nervosi intramurali (in basso nella parte colorata del disegno) o se, a causa della mancanza dell'endotelio (ad esempio, placche aterosclerotiche), diffonde dal plasma alle tonache muscolari del vaso (in alto nella parte colorata del disegno), esso attiva i recettori presenti sulle cellule muscolari lisce. L'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ che si ha in queste cellule è responsabile della contrazione e dell'eventuale riduzione del calibro del vaso.

sistema NO/G chinasi inibisce l'attività dei canali al Na^+ sensibili all'amiloride e può indurre trascrizione genica, attraverso l'aumentata espressione di c-fos e di $PGC1-\alpha$, l'attivazione del complesso AP-1 e dei cosiddetti "cyclic GMP responsive elements" presenti sui promotori di molti geni. Tra i geni regolati dal cGMP via G chinasi vi sono enzimi coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare tra cui le cicline e le proteine inibitrici delle loro chinasi (vedi Capitolo 27). Ad esempio, nell'endotelio l'aumento di espressione di p21 (Sdi1/Cip1/Waf1) e la ridotta espressione della cicline D1 ed E spiegano il rallentamento della transizione G1/S indotto da NO via G chinasi. Infine, NO è in grado di promuovere la biogenesi di mitocondri, aumentando l'espressione di $PGC1-\alpha$, che a sua volta promuove l'espressione dei fattori di trascrizione specifici per le proteine mitocondriali siano esse di origine nucleare o mitocondriale, come i complessi respiratori, complessi multimolecolari costituiti da subunità di origine sia nucleare che mitocondriale. La biogenesi dei mitocondri mediata da NO avviene in modo virtualmente ubiquitario; è a tuttavia particolarmente rilevante il ruolo che essa gioca nel muscolo scheletrico e nel sistema nervoso. Un suo difettoso funzionamento si accompagna spesso a malattie metaboliche importanti come la sindrome metabolica (vedi **CD**: Approfondimento 43.4).

Il cGMP agisce anche in modo non mediato da G chinasi. Esso stimola direttamente l'attività idrolitica di alcune fosfodiesterasi (2, 5, 6 e 10), attive sia nell'idrolizzare il cGMP stesso, che il cAMP. Questo meccanismo agisce come sistema di "feedback" negativo che controlla un'eccessiva espansione del segnale di NO/cGMP. Infine,

il cGMP aumenta la probabilità di apertura di alcuni specifici canali di membrana permeabili a Na^+ e Ca^{2+} (vedi Capitolo 22).

L'NO inibisce la citocromo c ossidasi e controlla la respirazione mitocondriale

La respirazione cellulare è un fenomeno regolato, da cui dipende il destino metabolico di una cellula. Questo controllo si esercita a livello della catena di trasporto elettronico mitocondriale in cui si consuma ossigeno per costruire il gradiente protonico transmembrana necessario alla sintesi di ATP. In condizioni di ipossia la cellula reagisce riducendo il consumo di ossigeno e quindi la sintesi di ATP; questo porta a un rallentamento dei processi metabolici e quindi a un ridotto consumo di energia. Questo controllo interno della respirazione è esercitato dalla cellula a livello della citocromo c ossidasi, il complesso terminale della catena di trasporto mitocondriale cui si lega l'ossigeno che viene "consumato" durante la respirazione. NO è il messaggero intracellulare responsabile della regolazione dell'attività della citocromo c ossidasi, costituendo con essa il sensore intracellulare per l'ossigeno. NO esercita questo controllo perché si lega reversibilmente alla citocromo c ossidasi sullo stesso sito in cui si lega l'ossigeno, e con simile affinità. Questo porta a competizione tra i due gas per l'enzima. In condizioni di normossia tissutale ($30 \mu M$ di O_2) il legame dell'NO è sfavorito e la respirazione procede normalmente. Al calare della concentrazione di ossigeno il legame dell'NO alla citocromo c ossidasi è favorito, l'enzima riduce la sua attività e di conseguenza la respirazione rallenta. Due

sono le conseguenze biologiche di questa regolazione, orchestrata da cellule competenti per la generazione di NO: da un lato si riduce progressivamente e in modo graduale la funzionalità mitocondriale, il che induce la cellula a "scegliere" la via glicolitica per produrre energia in anaerobiosi; dall'altro, si ridistribuisce l'ossigeno, che, non legandosi più alla citocromo c ossidasi, può essere veicolato ad altre cellule nell'intorno, ritardandone l'ingresso nella fase ipossica. È importante sottolineare, a questo proposito, che concentrazioni nanomolari di NO inibiscono la stabilizzazione del fattore HIF-1, primo segnale di allerta cellulare per l'ipossia.

La nitrosazione dei tioli (ovvero la conversione di gruppi SH in gruppi SNO) è un meccanismo di azione di NO estremamente dibattuto e per alcuni aspetti controverso

L'ambiente cellulare è di norma estremamente riducente, con concentrazioni di mercaptani, quali il glutatone ridotto (GSH), dell'ordine di 3-10 mM, a seconda del tipo cellulare. È stato dimostrato che i gruppi SH del GSH sono rapidamente accessibili a NO e ai suoi derivati reattivi (-OONO), che convertono questa molecola in nitroso glutatone (GSNO). Il gruppo SH di GSH compete molto efficacemente per l' NO/OONO con i gruppi SH presenti sulle proteine, agendo quindi da sistema tampone, che previene la S-nitrosazione di queste proteine da parte di NO. Molti studi nel passato hanno dimostrato la necessità di alte concentrazioni di NO per osservare la S-nitrosazione. In condizioni in cui si abbia espressione di NOS II, quali ad esempio l'infiammazione, la S-nitrosazione può di fatto avvenire e contribuire efficacemente alla generazione di un segnale fisiopatologico. La generazione di NO e di specie da esso derivate da parte di NOS II può infatti raggiungere concentrazioni tali da diminuire in modo significativo la concentrazione di gruppi SH liberi su GSH e altri mercaptani. All'esaurirsi del sistema tampone costituito dai mercaptani si può effettivamente avere S-nitrosazione di proteine. Il ruolo della S-nitrosazione nel contesto dell'infiammazione è di tipo antinfiammatorio e mediata attraverso la inibizione dell'attività della proteina D del surfattante (nei polmoni) e in generale di diverse citochine (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, MIP-2). Un ruolo fisiopatologico della S-nitrosazione è stato dimostrato chiaramente anche in altre condizioni patologiche in cui si abbia espressione di NOS II o preesistenti alterazioni dello stato redox. Nella tabella 43.2 sono elencate diverse proteine passibili di S-nitrosazione e la patologia umana in cui sono state identificate. Accanto a questi studi vi sono stati gruppi di ricerca che hanno sostenuto sperimentalmente l'ipotesi che la S-nitrosazione potesse avere un ruolo fisiologico nel mediare le risposte all'NO generato dalle isoforme costitutive di NOS, quindi di NO generato a concentrazioni nanomolari: mentre la maggior parte di questi studi era stata condotta in condizioni sperimentali artificiali, che non mimavano l'ambiente ossido riduttivo ottimale della cellula, alcuni di essi, ad esempio quelli riguardanti la S-nitrosazione del sensore per l'ipossia HIF-1, mostravano una S-nitrosazione di

tipo fisiologico in condizioni di normale stato redox cellulare. Una ragionevole spiegazione molecolare a questa apparente contraddizione risiede nel fatto che in questi casi specifici le NOS costitutive coinvolte sono fisicamente a contatto o co-localizzano con le proteine bersaglio; un calo transeunte di GSH nell'intorno della proteina target, facilitato dalla vicinanza con la sorgente di NO, può originare fenomeni reversibili di S-nitrosazione senza che il potenziale redox complessivo della cellula sia modificato. In questa categoria di eventi ricadrebbe anche la S-nitrosazione del recettore β -adrenergico e del recettore per la rianodina di tipo 2, che pare giustificare almeno in parte gli effetti cardioprotettivi dei nitrati organici nell'ischemia cardiaca (vedi oltre).

In generale la S-nitrosazione ha un effetto inibitorio: tra le proteine la cui funzione è inibita vi sono la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (via glicolitica), la glutatone perossidasi e la glutatone reduttasi (metabolismo del glutatone), la creatina chinasi, fosfotirosin-fosfatasi, i complessi I, II, III nella catena respiratoria mitocondriale (in cui si accompagna sovente a estrazione di ferro dai clusters Fe-S). L'inibizione dell'attività di queste proteine è importante nella risposta dell'organismo ad agenti patogeni (vedi oltre). Inoltre, la S-nitrosazione è un importante mediatore del danno cellulare. In alcuni casi, come quello dei recettori per la rianodina, essa ha invece funzione stimolatoria.

NO e micro RNA

Alcuni micro RNA possono regolare la generazione di NO e l'NO è in grado di regolare a sua volta l'espressione di alcuni di essi

I micro RNA sono piccole sequenze di RNA non codificanti che hanno funzione regolatoria sull'espressione genica. A oggi ne sono stati identificati più di 460, e si è dimostrato che alterazioni nella loro espressione sono coinvolte in diversi stati patologici, tra cui le patologie coronariche, le malattie neurodegenerative, la distrofia muscolare di Duchenne, diverse patologie autoimmuni e i tumori, in cui i micro RNA agiscono sia come promotori che come oncosoppressori. Nel caso della distrofia muscolare di Duchenne si è notato come la disregolazione della funzionalità della NOS I (vedi oltre) si accompagni a una alterata espressione di molti micro RNA coinvolti nella regolazione del metabolismo energetico muscolare e nella miogenesi riparativa (che verrebbero a essere inibiti). Nel caso del sistema cardiocircolatorio, si è visto come l'espressione del micro RNA miR-21 sia aumentata in cellule endoteliali da stimoli come lo "shear stress" che mimano l'attrito del flusso ematico; miR-21 aumenta la fosforilazione Akt-dipendente della NOS III e quindi la generazione di NO che è in grado, mediante vasodilatazione, di ridurre questo fenomeno potenzialmente patologico. L'inibizione delle NOS in vivo con l'inibitore endogeno della NOS, la dimetilarginina asimmetrica (ADMA) riduce l'espressione di miR-21 e si associa a deficit nella funzionalità delle cellule staminali

TABELLA 43.3 Patologie in cui si manifesta S-nitrosazione e bersagli proteici coinvolti

	Immunità adattiva	Angiogenesi	Morbo di Alzheimer	Asma	Fibrosi cistica	Diabete di tipo 2	Diabete di tipo 1	Distrofia muscolare di Duchenne	Disturbi endoteliali	Scoppio cardiaco	Sindrome del QT lungo	Infiammazione polmonare	Ipertermia maligna	Morbo di Parkinson	Pre-eclampsia	Iperensione polmonare	Ischemia cerebrale	Morte cardiaca improvvisa	Sensibilità ai chemioterapici
Arginasi				●					●										
Canale SNC5a per il sodio cardiaco											●								
Proteina correlata alla dinamina Drp-1			●																
Glutazione				●	●														
Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi														●					
Emoglobina							●									●			
HIF 1 α		●														●			●
Recettore insulinico β						●													
Substrato 1 per il recettore dell'insulina (IRS-1)						●													
Metallo proteinasi matriciale 9																	●		
Parchina			●											●					
Peroxiredoxina 2			●											●					
Proteina isomerasi dei disolfuri (PDI)			●											●					
Proteinchinasi B/Akt						●													
Ras	●																		
Recettore per la rianodina di tipo 1							●						●						●
Recettore per la rianodina di tipo 2										●									
Albumina sierica															●				
Proteina D del surfattante												●							
Inibitore dell'apoptosi legato al cromosoma X			●											●					
Deacetilasi degli istoni 2 (classe I)							●												

progenitrici dei vasi. Infine in pazienti affetti da grave scompenso acuto terminale si è visto che il miR-199a-5p aumenta l'espressione di ADMA; la susseguente ridotta produzione di NO potrebbe contribuire alla patogenesi di questa disfunzione cardiaca. miR-155 e miR-661 infine, sono in grado di aumentare e ridurre, rispettivamente, l'espressione di NOS II, anche se il significato biologico di questo evento non è chiaro.

Effetti sistemici e d'organo dell'ossido nitrico

Effetti a livello dell'apparato cardiovascolare

L'NO rilascia la muscolatura liscia vasale e contribuisce alla regolazione della pressione arteriosa

Come detto poc'anzi, la muscolatura liscia vasale rappresenta uno dei bersagli principali dell'azione biologica dell'NO. Composti capaci di rilasciare direttamente o

indirettamente NO (nitroderivati come nitroglicerina, nitroprussiato di sodio, Tabella 43.3) sono potenti vasodilatatori da tempo usati in alcune patologie cardiovascolari come l'angina pectoris, lo scompenso, le emergenze ipertensive.

Un contributo importante alla comprensione del ruolo dell'NO endogeno rilasciato dalle cellule endoteliali è stato fornito da studi condotti mediante l'impiego di farmaci inibitori delle NOS quali la L-NMMA o la L-NAME. Questi farmaci non solo inibiscono la vasodilatazione indotta da agenti quali acetilcolina, bradichimina e sostanza P, ma sono dotati di importanti effetti vasocontrittori. Quest'ultima evidenza sperimentale dimostra come l'NO sia rilasciato dalle cellule endoteliali in concentrazioni efficaci anche in condizioni di non stimolazione e suggeriscono che l'intero sistema circolatorio sia mantenuto sotto un continuo, stabile tono vasodilatante. Lo squilibrio di tale tono contribuisce alla patogenesi di alcune importanti patologie umane, quali l'ipertensione arteriosa e l'aterosclerosi. La regolazione del tono vascolare da parte di NO è anche importante nella fisiologia della contrazione

muscolare scheletrica. Gli effetti dell'NO sui vasi sono schematizzati nella figura 43.4.

L'NO è importante nella regolazione del circolo coronarico

Tra i distretti vascolari, quello che sembra dipendere più direttamente dal rilascio di NO da parte dell'endotelio vasale è il circolo coronarico. Il calibro vasale e le resistenze periferiche di questo distretto vengono accomodati, praticamente a ogni ciclo cardiaco, dal rilascio di mediatori endoteliali a breve durata di azione, tra cui l'NO. Una ridotta biosintesi di NO da parte delle cellule ematiche circolanti e delle piastrine può avere effetti nocivi sul circolo coronarico ed essere alla base di talune forme di cardiopatia ischemica, quale l'angina instabile, che si caratterizzano per l'associazione di vasocostrizione coronarica e aumentata aggregazione delle piastrine, fenomeno inibito da NO in modo dipendente dal cGMP. L'importanza dell'NO diviene particolarmente evidente in condizioni di ischemia miocardica. È noto che quando la perfusione del tessuto ischemico riprende (grazie anche al rilascio di diversi autacoidi e di adenosina da parte dello stesso tessuto ischemico), si generano localmente radicali liberi di ossigeno, quali O_2^- . Questi composti possono reagire con NO, formando $-OONO$ che contribuisce agli effetti dannosi sulle membrane cellulari e sulla funzione di numerose proteine. Inoltre, il consumo di NO che così si verifica ha un ulteriore effetto negativo sulla regolazione dei flussi intramurali che sono, in gran parte, dipendenti dal rilascio di NO. Tali evidenze spiegano come i nitrovasodilatatori rappresentino ancora uno dei presidi terapeutici di maggiore efficacia nel trattamento dei deficit di perfusione del muscolo cardiaco.

L'NO regola l'ipertensione arteriosa sia attraverso il tono del circolo sia modulando le funzioni renali

La scoperta dell'esistenza di un tono vasodilatante stabile, mantenuto da una produzione costante di NO, che mantiene la pressione arteriosa entro limiti fisiologici, ha cambiato totalmente il modo di vedere i sistemi di regolazione della pressione arteriosa e la patogenesi dell'ipertensione. Per quest'ultima il peso maggiore veniva attribuito alla modulazione dei fattori vasocostrittori, immaginando che l'accomodazione del tono vasale avvenisse per meccanismi a "feedback" negativo, in gran parte modulati dall'SNC, in cui, alla richiesta di riduzione della pressione arteriosa, seguiva una riduzione del "firing" del cosiddetto centro vasomotore del midollo allungato con conseguente ridotta secrezione periferica di catecolamine. La scoperta del ruolo di NO ha stimolato l'utilizzo di donatori di NO e di supplementi di L-arginina nella terapia dell'ipertensione.

La via metabolica L-arginina-NO è importante anche a livello renale e una sua alterazione può portare a ipertensione renale e reno-vascolare. L'NO regola positivamente la funzione glomerulare attraverso la vasodilatazione dell'arteriola afferente che, associata a un minore effetto a livello dell'arteriola efferente, si concretizza in un incremento finale del coefficiente di filtrazione glomerulare.

Inoltre l'NO, prodotto dalle cellule endoteliali dei vasi renali o dalle cellule del nefrone, regola la natriuresi e i fenomeni di retrocontrollo glomerulare. In questo contesto è interessante notare come il sistema dell'angiotensina II, il principale regolatore positivo della pressione di filtrazione glomerulare, abbia effetti inibitori sull'espressione della NOS a livello delle cellule della macula densa, la componente dell'apparato iuxtaglomerulare che rilascia la renina. Pertanto, l'aumento delle resistenze vascolari nel rene prodotto dalla stimolazione dei recettori AT1 per l'angiotensina si accompagna a ridotta biosintesi di NO a livello dell'apparato iuxtaglomerulare. Questo fenomeno può amplificare il danno associato a forme di ipertensione in cui il sistema dell'angiotensina sia sovrastimolato. Il ruolo dell'NO in queste forme di patologia renale è anche da ricercarsi nelle modificazioni che esso determina sul metabolismo dell'acido arachidonico, visto il ruolo fondamentale giocato dai prostanoidei nella fisiopatologia renale (vedi Capitolo 41). Effettivamente esiste una stretta correlazione positiva tra produzione di NO e attività della prostaglandina sintetasi, l'enzima contenente il gruppo eme che trasforma l'acido arachidonico in prostaglandine. Ad esempio, gli effetti emodinamici renali di L-NAME sono potenziati da indometacina, un potente inibitore della prostaglandina sintetasi.

L'NO protegge dall'aterosclerosi

Il buon funzionamento delle cellule endoteliali è necessario anche per respingere l'insulto di fattori aterogeni. Tali fattori sono rappresentati dall'attivazione piastrinica e da agenti rilasciati durante i processi di degranulazione piastrinica. Tra questi ci sono sostanze ad azione vasocostrittive e pro-aterogene e mitogeni di diversa natura che contribuiscono alla trasformazione delle cellule muscolari lisce del subendotelio in "foam cells". Oltre a inibire la degranulazione delle piastrine, le cellule endoteliali normalmente inibiscono l'adesione dei monociti circolanti e proteggono il subendotelio dai fattori aterogeni metabolici endogeni ed esogeni tra cui, in particolare, i lipidi circolanti.

Tra le proprietà importanti dell'NO vi sono l'inibizione dell'aggregazione piastrinica e dell'adesione dei leucociti all'endotelio. In effetti, negli stadi precoci dell'aterosclerosi, le alterazioni delle proprietà adesive dell'endotelio, che favoriscono l'insorgere della placca aterosclerotica, correlano temporalmente con una riduzione della produzione di NO da parte di NOS III. In vari modelli sperimentali di ipercolesterolemia, inclusi i modelli genetici, l'aggiunta di supplementi di L-arginina con la dieta è in grado di riportare verso la norma l'espressione di molecole di adesione, riduce gli effetti negativi sulle cellule endoteliali provocati dalla prolungata esposizione ad aggregati piastrinici, potenzia l'azione delle cellule endoteliali in senso anti-aterogeno, e riduce le lesioni xantomatose.

L'NO è importante nella patogenesi dell'ipotensione in corso di shock endotossico ipovolemico

Lo shock endotossico è uno stato di grave ipotensione determinato dalla liberazione in circolo di endotossine

batteriche che producono una vasodilatazione spesso resistente alla somministrazione di sostanze vasocostrittrici quali, ad esempio, le ammine simpaticomimetiche. L'ipotensione è dovuta al rilascio sia di sostanze provviste di azione vasodilatante, quali le chinine, che di alcune citochine prive di effetti emodinamici diretti, quali IL-1 β , IL-2 e TNF- α , che, tuttavia, sono in grado di indurre sintesi di NOS II nelle cellule muscolari lisce. La susseguente generazione continua di alte concentrazioni di NO ha un ruolo di primo piano nella patogenesi dello shock endotossico e anche della fase terminale dello shock ipovolemico, quando alla vasocostrizione generalizzata si sostituisce la vasodilatazione irreversibile che conduce a morte.

Studi clinici, in effetti, hanno dimostrato che l'impiego di inibitori della NOS (L-NMMA) ripristina una discreta reattività dei vasi sanguigni agli agenti vasocostrittori e riduce, di conseguenza, l'ipotensione marcata che accompagna l'endotossiemia. Tuttavia, l'impiego terapeutico di inibitori delle NOS non ha avuto successo in quanto non si traduce in un significativo miglioramento del quadro clinico. Questo è dovuto al fatto che nessuno degli inibitori in commercio è realmente selettivo per isoforme specifiche di NOS; l'effetto positivo dell'inibizione della NOS II è controbilanciato da quello negativo risultante dalla inibizione di NOS III che regola il tono basale dell'endotelio, e inibisce l'aggregazione piastrinica. Di fatto, pazienti trattati con inibitori della NOS mostravano sovente aumento delle resistenze periferiche arteriose e venose con riduzione della gittata cardiaca e danno tessutale da ipoperfusione, nonché iperaggregazione delle piastrine (soprattutto nei polmoni). Per ovviare a tale inconveniente sarebbero necessari antagonisti selettivi della NOS II, solo ora in fase di validazione preclinica. È importante ricordare che parte degli effetti benefici di alcuni farmaci utili nella terapia dello shock endotossico, quali il desametasone e altri glucocorticoidi, è legata alla capacità di inibire la produzione di citochine che inducono l'espressione della NOS II, senza quindi modificare l'espressione/attività di NOS III.

NO e sistema respiratorio

La NOS III è presente anche a livello delle cellule endoteliali dei vasi polmonari e la liberazione di NO rappresenta un momento fondamentale nella regolazione della funzionalità del circolo in questi due organi. È da notare che, sia nell'uomo che nell'animale da esperimento, l'aria espirata contiene concentrazioni misurabili di NO e che tale gas è di origine polmonare. In questo organo la NOS è presente anche nelle cellule epiteliali, nelle terminazioni nervose non-adrenergiche non-colinergiche, nei macrofagi, nei mastociti e nei neutrofilo. Sebbene il ruolo fisiologico dell'NO a livello polmonare non sia stato ancora caratterizzato in maniera definitiva, l'impiego clinico dell'NO, somministrato per inalazione in forma gassosa, viene proposto oggi in alcuni Paesi nel trattamento dell'ipertensione polmonare cronica e dell'insufficienza respiratoria neonatale, situazioni cliniche in cui NO

aumenta significativamente l'ossigenazione del circolo arterioso. Inoltre, la stimolazione della generazione di cGMP intracellulare, sia tramite inibizione della fosfodiesterasi 5 che tramite attivatori della guanilato ciclasi, è efficace nel trattamento dell'ipertensione polmonare.

NO e malattie metaboliche

Evidenze sempre più numerose suggeriscono il coinvolgimento del sistema nitregico nei meccanismi patogenetici di alcune tra le malattie metaboliche più diffuse nelle società a stile occidentale, come l'insulinoresistenza, il diabete mellito di tipo 2 e la sindrome metabolica. Con quest'ultimo termine si indica la presenza contemporanea di diversi stati morbosi nello stesso paziente, segnatamente di accumulo viscerale di grasso, ipertensione arteriosa, insulinoresistenza e ipertrigliceridemia.

La correlazione potenzialmente importante tra insulinoresistenza e concentrazioni plasmatiche dell'inibitore endogeno della NOS, ADMA, è stata suggerita dall'osservazione di una relazione positiva tra insulinoresistenza e livelli circolanti di ADMA, indipendentemente da altri fattori eventualmente presenti nello stesso soggetto, come un'elevata pressione arteriosa o l'ipertrigliceridemia. Nei pazienti con ridotta sensibilità all'insulina, la funzione endoteliale è compromessa: in particolare, la vasodilatazione dipendente dall'NO è alterata, i livelli plasmatici dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1 e dell'endotelina sono aumentati. Gli elevati livelli plasmatici di ADMA giocherebbero un ruolo rilevante nel determinare la disfunzione endoteliale che si osserva nei pazienti affetti da insulinoresistenza. Tale correlazione è rafforzata dal fatto che la somministrazione di farmaci in grado di migliorare la sensibilità insulinica, come i tiazolidinedioni, tra cui in particolare il rosiglitazone che viene impiegato nella terapia farmacologica del diabete di tipo 2, riducono in maniera significativa i livelli plasmatici di ADMA.

Oltre che in pazienti con insulinoresistenza, elevati livelli circolanti di ADMA sono stati riscontrati in varie altre condizioni patologiche, come l'ipertensione arteriosa essenziale, la dislipidemia, l'iperglicemia, l'iperomocistinemia e l'insufficienza renale. L'ADMA in elevate concentrazioni plasmatiche è ritenuta una causa di disfunzione endoteliale in tali condizioni. L'ADMA riduce infatti l'attività della NOS III e aumenta lo stress ossidativo dell'endotelio oltre all'adesione dei monociti allo stesso. Elevati livelli plasmatici di ADMA sono stati associati anche a un aumentato rischio di malattie cardiovascolari. Le recenti osservazioni sull'intreccio tra ADMA espressione di NOS e micro RNA apre nuove prospettive sia di ricerca che di potenziali approcci terapeutici nelle succitate patologie.

NO e sistema nervoso centrale e periferico

La NOS I è presente in numerose aree dell'SNC, in particolare nel cervelletto, nel bulbo olfattorio e nell'ippocampo. Nel cervelletto l'enzima è localizzato a livello

delle cellule dei granuli e di interneuroni quali le cellule a canestro, mentre non è presente nelle cellule di Purkinje. Nell'ippocampo la NOS I è presente nei granuli del giro dentato e in interneuroni, mentre è assente nei neuroni piramidali. L'NO, inoltre, può essere generato dalla componente gliale. Gli astrociti possiedono NOS III e possono esprimere, in condizioni di ipossia, anche la NOS II.

L'estrema complessità e articolazione dei rapporti tra componente endoteliale dei vasi del microcircolo, neuroni e cellule gliali capaci di rilasciare NO rende particolarmente complesso il ruolo giocato dall'NO nelle varie funzioni connesse al sistema nervoso. Gli astrociti, in particolare, per la loro posizione a cavallo dei vasi del microcircolo cerebrale e delle cellule nervose, rappresentano un importante elemento di connessione non solo anatomica ma anche funzionale tra i diversi sistemi cellulari dell'SNC. La stretta contiguità con i neuroni nel vallo sinaptico fa sì che gli astrociti partecipino attivamente alle funzioni neurotrasmettitoriali. Essendo in grado di rilasciare NO, gli astrociti possono interferire sulle terminazioni sinaptiche vicine, modulando il rilascio dei neurotrasmettitori (Figura 43.5).

■ L'NO modula la plasticità sinaptica e la memoria

I fenomeni di plasticità sono importanti nella strutturazione delle connessioni sinaptiche e sono alla base di molteplici aspetti dell'apprendimento e della memoria. Tra questi sono stati particolarmente studiati la *Long Term Potentiation* (LTP) e la *Long Term Depression* (LTD), che sono considerate correlati elettrofisiologici dei processi di apprendimento e memoria. LTP e LTD possono essere indotte a livello ippocampale da stimolazione a frequenze specifiche di alcuni circuiti neuronali e consistono in un potenziamento o in una riduzione della risposta sinaptica che persiste per ore o giorni. L'induzione di LTP è strettamente dipendente dall'attivazione di recettori-canale per il glutammato di tipo NMDA: è l'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ da essi indotto a provocare variazioni omeostatiche dirette e indirette sia a livello postsinaptico che presinaptico (vedi Capitolo 38). Studi antecedenti alla scoperta dell'NO avevano mostrato come LTP ed LTD richiedessero un mediatore che fosse in grado di funzionare in senso retrogrado. Per le sue caratteristiche, l'NO era un potenziale candidato a svolgere questa funzione. Numerose evidenze sperimentali oggi sostengono l'ipotesi che NO sia in grado di modulare la trasmissione sinaptica, e quindi anche LTP ed LTD. Questa azione di NO è favorita dalla specifica localizzazione della NOS I nella densità postsinaptica in prossimità dei recettori-canale AMPA ed NMDA per il glutammato, grazie alla sua interazione con la proteina PSD95 (vedi CD: Approfondimento 43.3). Nella figura 43.5 sono riassunte le evidenze note riguardo alla LTP: il rilascio di glutammato alla presinapsi genera NO nella postsinapsi, attraverso una via che coinvolge proprio i recettori-canale AMPA ed NMDA. L'NO così generato diffonde nella presinapsi e lì agisce attivando la guanilato ciclasi. L'incremento dei livelli di cGMP e la conseguente attivazione di chinasi specifiche aumen-

tano la secrezione di neurotrasmettitore, e sono quindi alla base degli effetti modulatori sull'attività sinaptica. L'attivazione Ca^{2+} -dipendente della NOS e la conseguente generazione di NO sono in grado di rendere refrattarie per lunghi periodi le sinapsi potenziate riducendo, così, la probabilità che LTP si trasformi in attività epilettica. Tale fenomeno si basa sulla dimostrata azione inattivante dell'NO sulle correnti del Ca^{2+} evocate dalla stimolazione del recettore NMDA. La correlazione tra attivazione recettoriale e produzione di NO è stata descritta anche per i recettori del glutammato di tipo non-NMDA e per i recettori muscarinici. Nonostante la solidità di queste evidenze, tuttavia, vi è consenso, sperimentalmente provato,

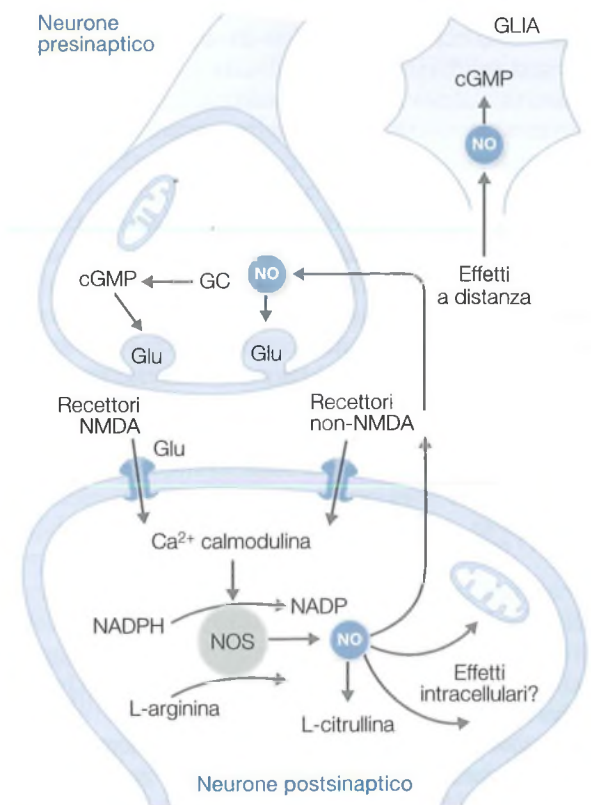


FIGURA 43.5 Rapporti tra neurotrasmissione eccitatoria, sintesi dell'NO e comunicazione sinaptica. In seguito a depolarizzazione del neurone presinaptico, il glutammato (Glu) viene rilasciato dalla terminazione nervosa e attiva i recettori non-NMDA (essenzialmente AMPA) presenti sulla membrana del neurone postsinaptico e che inducono depolarizzazione per ingresso di Na^+ . La depolarizzazione consente l'ingresso di Ca^{2+} nel neurone attraverso i recettori di tipo NMDA attivati dal glutammato (vedi Capitolo 38). L'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ attiva la NOS neuronale (NOS I ma a volte anche NOS III) che sono Ca^{2+} -calmodulina-dipendenti. L'NO formato può sia agire a livello della sede di formazione che diffondere nello spazio extracellulare e stimolare la guanilato ciclasi (GC) a livello delle terminazioni nervose e della glia. L'NO, a livello presinaptico, ha azione facilitante il processo di fusione delle vescicole contenenti il glutammato, stimolando così un maggiore rilascio del neurotrasmettitore. Questi eventi sono alla base della LTP sostenuta da NO. Nelle forme di LTP prolungata l'NO può avere anche effetti strutturali nella zona postsinaptica presumibilmente legati alla sua capacità di indurre trascrizione genica (vedi CD: Approfondimento 38.1).

nel ritenere che l'NO agisca non in modo ubiquitario nei fenomeni di LTP ed LTD, ma solo in determinate circostanze e in circuiti neuronali definiti. Analoghe considerazioni possono essere fatte per il corrispettivo in vivo dei fenomeni di plasticità sinaptica, ovvero l'apprendimento e la memoria. Molti studi hanno documentato come l'inibizione delle NOS I e III, attraverso farmaci inibitori o mediante l'uso di RNA antisense, porti effettivamente a deficit in alcune funzioni cognitive (ad esempio, compromissione nei test di esitamento passivo e di memoria spaziale negli animali da laboratorio). Tuttavia alcune funzioni cognitive, come ad esempio l'apprendimento spaziale, non sono influenzate dalla generazione di NO.

■ L'NO e sindromi emicraniche

Lemicrania classica è prodotta da una vasodilatazione dei vasi subdurali ed epidurali con la conseguente risposta cefalalgica a carattere accessuale. Alla base della persistente vasodilatazione che rappresenta il substrato fisiopatologico dell'emicrania vi è in molti casi un'abnorme attivazione della via metabolica L-arginina-NO: la maggior parte delle forme di emicrania classica, sia con aura che senza aura, può essere scatenata dalla somministrazione di farmaci donatori di NO quali il nitroprussiato di sodio o i nitrati organici (il classico test alla nitroglicerina, in uso nei centri per la diagnosi delle cefalee). Studi clinici hanno dimostrato una certa efficacia degli antagonisti della NOS nel trattamento di varie forme di emicrania. L'uso clinico di questi farmaci, se confermato da studi più ampi, potrebbe contribuire alla terapia di questa patologia.

■ L'NO modula l'asse ipotalamo-ipofisario

Alcuni neuroni situati nei nuclei sopraottico e paraventricolare dell'ipotalamo esprimono NOS I. La stimolazione di questi nuclei porta alla secrezione da parte dei neuroni del fattore di rilascio delle corticotropine (CRF), che poi attiva le cellule dell'ipofisi anteriore a rilasciare l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), favorendo l'increzione di corticosteroidi a livello della ghiandola surrenale. La generazione di NO a livello ipofisario è necessaria al rilascio di CRF da parte di importanti mediatori attivi su questa via, quali la vasopressina, l'ossitocina e gli oppioidi, mentre l'NO non pare coinvolto nella secrezione di CRF mediata da noradrenalina. Neuroni esprimenti NOS I nell'ipotalamo e nell'eminenza mediana sono rilevanti anche nel controllo della fertilità. La generazione di NO da parte di questi neuroni è necessaria all'increzione dell'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH), che stimola la secrezione di ormoni luteinizzante (LH) e follicolostimolante (FSH) nell'ipofisi anteriore, responsabili della steroidogenesi e della gametogenesi. Topi femmine "knockout" per NOS I manifestano una ridotta fertilità; la ragione di questa sterilità relativa non pare dovuta ad alterazioni nell'estro, in quanto non compaiono grossolane alterazioni nel ciclo mestruale, quanto piuttosto a un danno a livello degli oociti, che mostrano una marcata riduzione nella capacità di entrare nelle tube di Fallopio.

■ L'NO, come neurotrasmettitore del sistema vegetativo non-adrenergico e non-colinergico, controlla la funzionalità viscerale

Le vie nitreggiche (in cui NO agisce come neurotrasmettitore) rappresentano un importante componente del sistema vegetativo in cui l'acetilcolina e la noradrenalina non agiscono da neurotrasmettitori naturali (note con il nome di fibre NANC: Non-Adrenergiche e Non-Colinergiche), e sono responsabili dell'innervazione autonoma della muscolatura liscia gastrointestinale, di organi pelvici, delle vie respiratorie e del sistema genito-urinario. Vie nitreggiche regolano lo svuotamento gastrico e la progressione dell'onda peristaltica, stimolano l'assorbimento gastrointestinale di elettroliti e aumentano la secrezione gastroduodenale di muco e bicarbonato. Infine, agiscono in modo da prevenire un'eccessiva secrezione gastrica acida, svolgendo quindi un ruolo protettivo ed eupeptico. Non sorprende dunque il fatto che alcune patologie del tratto gastroesofageo, ad esempio l'acalasia dell'esofago, siano dipendenti da una degenerazione delle terminazioni nitreggiche del plesso mioenterico (nel caso specifico, a livello del terzo distale dell'esofago). L'NO è importante anche nella trasmissione nervosa a livello penieno. La stimolazione delle fibre nitreggiche a livello del tessuto cavernoso del pene e dei muscoli anococcigei si accompagna alla liberazione di NO da parte della NOS I presente in straordinaria quantità in tali fibre nervose. L'aumento dei livelli di cGMP e la dilatazione di vasi post-capillari che ne conseguono aumentando il turgore dei corpi cavernosi concorrendo in maniera determinante all'erezione del pene.

NO e apparato muscolare

■ L'NO controlla la fisiologia e la riparazione del muscolo scheletrico

Nel muscolo l'NO è prodotto da un'isoforma specifica della NOS I, chiamata NOS-I μ e dalla NOS III. L'NO controlla la fisiologia muscolare e regola i processi di riparazione del muscolo, processi particolarmente importanti in questo tessuto che si danneggia non solo in caso di traumi o malattie degenerative muscolari, ma anche nel corso della normale attività contrattile. Il ruolo di NO nel riparo del muscolo scheletrico, studiato con grande intensità negli ultimi cinque anni, ha portato alla definizione di una nuova possibilità di intervento farmacologico nella terapia delle malattie degenerative del muscolo quali le distrofie muscolari. Il ruolo della NOS-I μ come generatore di NO nel muscolo scheletrico appare particolarmente rilevante; tale enzima è infatti localizzato al complesso distrofina-glicoproteine (Figura 43.6). Il complesso distrofina-glicoproteine è un aggregato di proteine e glicoproteine integrali di membrana e periferiche raggruppate in almeno tre sottocomplessi principali: distroglicano, sarcoglicano e sintrofina. Nel muscolo il complesso distrofina-glicoproteine funge da ponte attraverso la membrana plasmatica tra l'actina del citoscheletro e la matrice extracellulare, agendo sia come

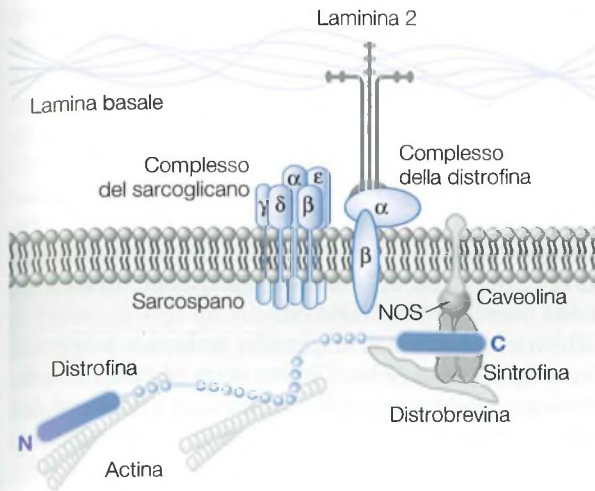


FIGURA 43.6 Organizzazione molecolare delle componenti del complesso distrofina-glicoproteina. La NOS I lega l' α -sintrofina attraverso il dominio PDZ presente su entrambe le proteine; il dominio contiene il motivo GLGF. Sono indicati nella figura gli altri componenti essenziali del complesso multiproteico contenente la NOS I e le loro interazioni con elementi chiave della lamina basale e del citoscheletro.

strumento di consolidamento meccanico della miofibrilla che come sistema trasduttivo e sensore della contrazione muscolare. L' α -sintrofina nel complesso distrofina-glicoproteina possiede un dominio PDZ; questo permette l'ancoraggio della NOS-1 μ al complesso stesso attraverso il suo dominio PDZ all'N terminale (vedi CD: Approfondimento 43.3) localizzando quindi l'enzima in posizione favorevole per "sentire" l'attività muscolare, grazie alla vicinanza con i canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti, in maniera non dissimile concettualmente da quanto descritto in precedenza per le sinapsi nervose. Grazie a questo suo collegamento funzionale con l'attività muscolare, NO regola l'accoppiamento eccitazione-contrazione in modo da minimizzare il danno muscolare durante la contrazione stessa. Questo avviene grazie un controllo inibitorio della contrazione sia fisiologica che tetanica, ma tale da non ridurre la forza massimale di contrazione esprimibile dal muscolo. NO inoltre regola i potenziali d'azione e di riposo della giunzione neuromuscolare. Molti di questi effetti sono legati agli effetti inibitori di NO sull'omeostasi del Ca^{2+} . Il secondo parametro rilevante regolato da NO nel muscolo è il bilancio energetico, in quanto NO contribuisce significativamente ad accoppiare il fabbisogno accresciuto di energia nel muscolo in contrazione con una aumentata disponibilità di energia. Questo avviene grazie all'induzione di vasodilatazione, e quindi a un aumento di flusso ematico e quindi di ossigeno e di nutrienti, a un aumento dell'espressione del trasportatore per il glucosio GLUT4, all'induzione di biogenesi dei mitocondri, alla regolazione della respirazione, e alla regolazione di enzimi rilevanti nel bilancio energetico come la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi, l'aconitasi e la creatina chinasi. Questa pleiotropia di

effetti di NO nel muscolo, tesi a minimizzarne il danneggiamento fisiologico, è mediata in vario modo da tutte e tre le azioni biochimiche di NO, aumento di cGMP, inibizione della citocromo c ossidasi, e S-nitrosazioni (vedi sopra e tabella 43.3).

NO gioca un ruolo rilevante anche nella miogenesi, processo rilevante non solo nella vita embrionale e fetale, ma anche nella vita adulta perché porta al riparo del muscolo una volta che esso sia danneggiato. Questa azione viene svolta da cellule staminali miogeniche ancora in via di completa caratterizzazione morfofunzionale. Tra queste le cellule satelliti, coinvolte nella rigenerazione muscolare durante la degenerazione patologica o dopo danno meccanico sono le più importanti e ben caratterizzate. Esse sono una piccola popolazione di cellule indifferenziate che risiedono quiescenti nel muscolo scheletrico adulto, tra sarcolemma e lamina basale, e che si attivano per il rimodellamento e la riparazione in seguito al danno muscolare, proliferando e infine fondendosi direttamente alle miofibre danneggiate o tra di loro. NO, agendo attraverso meccanismi cGMP-dipendenti, promuove la attivazione di queste cellule, stimolando l'increzione del fattore di crescita specifico HGF (*Hepatocyte Growth Factor*). NO inoltre facilita la fusione delle cellule satelliti tra loro o alla miofibrilla, attraverso la increzione di follistatina, una proteina che interagisce e regola l'attività biologica di alcuni membri della famiglia del TGF- β , inclusi BMP-4, BMP-7 e activine, e blocca l'attività della miostatina, un regolatore negativo della proliferazione della massa muscolare scheletrica. Questa via NO-mediata coinvolge anche MyoD, il fattore nucleare di attivazione delle cellule T (NFAT) e le proteine che legano gli elementi responsivi al cAMP.

NO e sistema immunitario

L'NO è un fine regolatore del sistema immunitario

La definizione del ruolo di NO nei processi infiammatori è stata a lungo basata sulla sua capacità di indurre citostasi ed effetti antimicrobici e antitumorali diretti. Anche se questa definizione di base è ancor valida, studi svolti negli ultimi dieci anni hanno portato alla scoperta di molti altri ruoli dell'NO, che ne fanno un mediatore essenziale nella regolazione fine della risposta immunitaria.

Localizzazione delle NOS nelle cellule immunocompetenti

Molte cellule del sistema immunitario esprimono NOS III oppure NOS II (quest'ultima in genere dopo attivazione cellulare). La NOS III è stata ritrovata in linfociti T e B, macrofagi e cellule "natural killer". L'espressione di NOS III in queste cellule non è in genere costitutiva, ma successiva a stimoli di attivazione specifici per ciascun tipo cellulare. L'espressione di NOS II può essere osservata in macrofagi attivati, cellule B attivate, e in cellule "natural killer"; in alcuni casi anche le cellule dendritiche, una volta giunte negli organi linfatici, possono esprimere questo enzima. L'espressione di NOS II

può essere stimolata da citochine (tra cui IL-2, IL-18, IL-12, IFN- γ e chemochine (tra cui SDF-1), agenti da sole o in varie combinazioni. L'espressione di NOS II è aumentata anche in seguito a infezioni batteriche o virali. Il meccanismo di induzione di NOS II da parte dei virus (HIV, HTLV-1) non è ancora chiaro. I batteri, invece, agiscono essenzialmente attraverso l'attivazione di recettori "toll-like" (TLR). Ad esempio, LPS stimola l'espressione di NOS II attraverso il TLR-4, la flagellina dei batteri Gram negativi agisce stimolando TLR-5, mentre componenti rilasciate da *Salmonella typhimurium* o *Mycobacterium tuberculosis*, agiscono attraverso TLR-2 e 9, rispettivamente. Infine, NOS II può essere stimolata dall'attivazione di recettori apoptogeni, tra cui CD40, CD95 e il recettore di tipo primo del TNF- α (vedi **CD**: Approfondimento 43.5. *Ruolo dell'ossido nitrico nell'infiammazione e nella patologia tumorale*).

■ Ruolo di NO nel controllo delle infezioni

La generazione di grandi quantità di NO da parte di NOS II svolge azione litica. In modelli sperimentali di infezione sostenuta da *Leishmania* o *Schistosoma*, il pretrattamento con L-NMMA riduce o abolisce completamente il potere citotossico dei macrofagi verso tali specie protozoarie. Inoltre, in topi "knockout" per la NOS II si ha una scarsa resistenza alle infezioni da batteri intracellulari. Il ruolo importante dell'NO come agente di difesa in tali infezioni è dimostrato dalla capacità di pomate contenenti un donatore di NO (SNAP, Tabella 43.3) di curare le lesioni cutanee indotte nell'uomo da *Leishmania*. Il meccanismo dell'azione battericida dell'NO non è stato ancora chiarito in modo univoco. L'NO, prodotto in grandi quantità, è in grado di generare $\cdot\text{OONO}$ e bloccare l'attività delle deidrogenasi batteriche, incluse quelle responsabili della respirazione del microrganismo, privando di ferro i "cluster" Fe-S. Inoltre, l'NO induce morte per apoptosi dei macrofagi infettati, facilitando così l'eliminazione dell'infezione. Un ruolo importante al riguardo è giocato dall'induzione NO-dipendente della sintesi della proteina pro-apoptotica p53 (vedi Capitolo 27). Dati recenti suggeriscono che p53 operi inducendo la trascrizione di geni in grado di modificare l'equilibrio ossidoriduttivo del macrofago, facilitando quindi l'instaurarsi del processo apoptotico. Inoltre l'NO può agire attraverso la generazione di specie citotossiche come OH \cdot e H $_2$ O $_2$. Infine, molti patogeni, ad esempio *Trypanosoma cruzi*, *Giardia lamblia* e *Schistosoma mansoni* necessitano di L-arginina per la sintesi di poliammidi e per la loro proliferazione. L'espressione di NOS II e l'effetto delle citochine sulle argininas contribuiscono a ridurre la biodisponibilità di questo aminoacido. Recentemente è stato scoperto che l'azione battericida dell'NO si gioca anche sul fronte dei linfociti T di prima barriera (dotati del recettore Ty δ per i superantigeni). La stimolazione antigenica indotta dalla presenza del batterio provoca espressione marcata della NOS III nei linfociti. Tale enzima rimane presente fino a che esiste lo stimolo antigenico capace di attivare le cellule T. L'NO prodotto facilita la proliferazione dei linfociti ed

evita il loro naturale processo di autoeliminazione per apoptosi, permettendo loro di contribuire in modo più efficace alla difesa dai patogeni intracellulari. L'NO può facilitare anche la presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche. In particolare ne aumenta la capacità sia di endocitare antigeni rilevanti al sito di infezione, sia di attivare i cloni T linfocitari specifici. Questo effetto è dovuto all'aumento sia dell'espressione del recettore per IL-12 sulle cellule T che della secrezione di IL-12 da parte delle cellule dendritiche, indotto in modo coordinato da NO/cGMP.

Evidenze sperimentali e cliniche indicano infine un coinvolgimento di NO nell'infiammazione cronica, nelle patologie autoimmuni, nella chemiotassi e adesione dei leucociti e nei tumori. Per questi aspetti più specialistici, vedi **CD**: Approfondimento 43.5.

Farmacologia dell'ossido nitrico

I farmaci che interferiscono con la generazione di NO o con le sue vie di trasduzione prossimali sono elencati nella tabella 43.3. Alcuni di questi farmaci sono entrati da tempo nella pratica clinica, essendo utilizzati anche prima della scoperta dell'NO. Di seguito sono descritte le classi di farmaci più importanti per il loro impatto in terapia.

Nitrovasodilatatori tradizionali

La scoperta delle proprietà antiangina di amil nitrito e di nitroglicerina è lontana nel tempo, nella seconda metà del 1800. Successivamente vennero identificati altri farmaci, isosorbide mono e dinitrato, e molsidomina, utilizzati per la terapia dell'angina, dell'infarto del miocardio, dello scompenso cardiaco. Un altro farmaco, sodio nitroprusiato, è stato usato in terapia per risolvere crisi ipertensive acute. La scoperta del ruolo biologico dell'NO ha fornito le basi per comprendere il meccanismo d'azione di questi farmaci. Questo capitolo non è la sede per una trattazione diffusa di questi farmaci, ma preme ricordare un aspetto rilevante nell'utilizzo di nitroglicerina, amil nitrito e isosorbide dinitrato, ossia l'instaurarsi di tolleranza ai loro effetti farmacologici qualora non si consideri una finestra temporale giornaliera di sospensione di trattamento con il farmaco. Diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare questo fenomeno. Studi recenti hanno individuato nella aldeide deidrogenasi mitocondriale di tipo 2 (ALDH-2) il responsabile maggiore di tale effetto, incluso lo sviluppo di tolleranza crociata tra nitrati organici. L'utilizzo del precursore di NO, L-arginina, studiato in clinica con l'idea di fornire il substrato metabolico per generare endogenamente NO si è rivelato invece poco efficace, probabilmente a causa delle molteplici vie di metabolismo di questo aminoacido alternative a quella catalizzata dalle NOS (Figura 43.1).

Esteri nitrici di farmaci noti

Le proprietà farmacologiche dei nitrati organici, me-

diate da NO, hanno stimolato la generazione di nuove classi di potenziali farmaci, oggi in fase di sviluppo. Si tratta di nuove molecole a meccanismo d'azione multiplo, in cui si legano nitrati organici mediante strutture chimiche (*spacer*) a farmaci già utilizzati in terapia. Un esempio rappresentativo sono gli antinfiammatori (FANS, vedi Capitolo 39) donatori di NO (CINOD, *Cyclooxygenase Inhibiting Nitric Oxide Donors*). In presenza del corredo enzimatico di cellule e tessuti, avviene una idrolisi che porta alla formazione del FANS di partenza e di un rilascio lento di NO. È noto che i FANS portano con sé effetti collaterali quali lesioni delle mucose gastriche e intestinali, e aumento della pressione sistolica con il conseguente aumento degli eventi avversi cardiovascolari. L'introduzione delle proprietà di NO nella molecola FANS attenua gli effetti lesivi gastrointestinali grazie all'attivazione del microcircolo locale e all'inibizione di processi infiammatori quale l'adesione leucocitaria. Inoltre, NO impedisce il rialzo pressorio indotto da FANS. Il risultato finale è un farmaco con migliore tollerabilità e sicurezza. Un esempio che merita attenzione è il naproxcinod, un donatore di NO derivato da naprossene, in fase avanzata di sviluppo. In numerosi studi clinici naproxcinod ha dimostrato efficacia nel trattamento del dolore acuto e cronico associato a patologie osteoarticolari, senza aumentare la pressione arteriosa sistemica.

Di interesse anche alcuni derivati di flurbiprofene che, grazie alla buona penetrazione della barriera ematoencefalica, agiscono in modelli sperimentali di infiammazione cerebrale. Flurbiprofene e ibuprofene modificati come donatori di NO sono stati inoltre studiati con successo in modelli murini di distrofia muscolare dove hanno determinato un significativo rallentamento della progressione della malattia con miglioramento della morfologia e recupero funzionale del muscolo. Questi studi hanno aperto la strada a nuovi approcci terapeutici nella distrofia muscolare di Duchenne in via di studio clinico nei pazienti.

Altri potenziali farmaci basati su questo approccio molecolare sono in fase di studio clinico per il trattamento di patologie oculari. Ad esempio, un donatore di NO derivato di latanoprost è in fase di valutazione clinica in pazienti con elevata ipertensione oculare, il principale fattore di rischio del glaucoma. Steroidi donatori di NO sono promettenti per il trattamento della retinopatia diabetica in quanto NO previene il rischio di glaucoma indotto dagli steroidi.

Stimolatori dell'azione di cGMP

Fra i modulatori della via di NO hanno avuto successo gli inibitori della fosfodiesterasi 5 selettiva per il cGMP. Grazie a questo meccanismo viene elevato il cGMP intracellulare e quindi attivata una serie di attività farmacologiche tipicamente associate a NO. Il capostipite della classe è il sildenafil (Viagra). Questo farmaco è efficace nella terapia dell'impotenza maschile, in quanto aumenta la dilatazione di vasi post-capillari accrescendo il turgore dei corpi cavernosi e, di conseguenza, l'erezione peniena. Il successo di sildenafil ha stimolato la ricerca di altri farmaci simili, quali vardenafil e tadalafil. L'applicazione terapeutica degli inibitori della fosfodiesterasi 5 è stata poi ampliata: sildenafil e tadalafil hanno dimostrato efficacia e sono stati approvati per il trattamento dell'ipertensione polmonare. Recenti studi hanno inoltre evidenziato un possibile loro impiego nella cardiopatia associata alla distrofia muscolare di Duchenne.

La ricerca di meccanismi per aumentare la concentrazione intracellulare di cGMP ha consentito inoltre di sviluppare gli attivatori della guanilato ciclasi. Alcuni composti quali riociguat, cinaguat e ataciguat sono in sperimentazione clinica per il trattamento dello scompenso cardiaco congestizio e dell'ipertensione polmonare.

Inibitori delle NOS

Se le strategie volte a potenziare la via di NO/cGMP hanno mostrato una notevole validità terapeutica, questo non è stato finora il caso delle strategie volte a inibire le NOS, che pure sarebbero potenzialmente importanti nella terapia dello shock endotossico e di alcune malattie neurodegenerative e infiammatorie croniche (tra cui il morbo di Crohn e altre infiammazioni intestinali croniche). Gli inibitori delle NOS non hanno avuto sviluppo clinico nonostante alcuni risultati interessanti ottenuti in laboratorio. Un primo problema è stato il fatto che i primi inibitori delle NOS non erano isoforma-specifici. Altri composti che hanno mostrato selettività per NOS I (ad esempio, GW273629 e GW274150) si sono mostrati utili nel ridurre l'ileo postoperatorio sperimentale e nel mitigare la sintomatologia nei modelli di shock endotossico e di danno gastrointestinale da FANS. Un altro farmaco sperimentale (AR-C102222) ha mostrato una qualche utilità nel ridurre l'edema da carragenina e migliorare il quadro clinico in modelli animali di artrite. Tuttavia, nonostante le ampie ricerche svolte negli anni, non sono ancora emerse molecole di interesse clinico.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'ossido nitrico è un messaggero a breve emivita che agisce su bersagli diversi a seconda della modalità della sua generazione endogena o somministrazione esogena.
- ▶ L'interazione dell'ossido nitrico con la citocromo c ossidasi e la guanilato ciclasi avviene a concentrazioni nanomolari e media le risposte fisiologiche al messaggero, mentre la nitrosazione dei tioli media nella maggior parte dei casi risposte fisiopatologiche.
- ▶ Le risposte fisiologiche dell'ossido nitrico regolano la trasduzione del segnale e il metabolismo cellulare, mentre le reazioni fisiopatologiche mediano effetti legati a stati prepatologici quali l'infiammazione.
- ▶ L'ossido nitrico è un messaggero endogeno ubiquitario e pertanto agisce in tutti i distretti dell'organismo generando risposte coordinate complesse.
- ▶ I farmaci attualmente in uso hanno indicazione nel campo della patologia cardiovascolare. Vi sono nuove molecole e nuovi approcci con farmaci già in uso clinico, per i quali si intravede la possibilità di impiego nelle patologie infiammatorie e nelle malattie degenerative del muscolo scheletrico.

Bibliografia essenziale

- ▶ Alderton WK, Cooper K, Knowles R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical J* 2001;357:593-615.
- ▶ Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996;271:C1424-37.
- ▶ Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999;1411:351-69.
- ▶ Foster MW, Hess DT, Stamler JS. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends in Molecular Medicine* 2009;15:391-404.
- ▶ Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
- ▶ Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Ann Rev Physiol* 1995;57:737-69.
- ▶ Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-6.
- ▶ Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 1997;20:298-303.
- ▶ Ignarro LJ. Nitric oxide, Biology and Pathobiology. San Diego: Academic Press, 2000.
- ▶ Lucas KA, Pitari GM, Kaserounian S et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000;52:376-413.
- ▶ Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- ▶ Nisoli E, Clementi E, Carruba MO, Moncada S. Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? *Circulation Research* 2007;100:795-806.
- ▶ Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6.
- ▶ Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
- ▶ Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S et al. Nitric oxide and cardiac function. *Life Sciences* 2007;81:779-93.
- ▶ Vincent SR. Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Progress in Neurobiology* 2010;90:246-55.

Gli Autori desiderano ringraziare Ennio Ongini per il suo contributo alla revisione del testo e alla preparazione del paragrafo su NO e farmaci, ed Enzo Nisoli che ha contribuito nella precedente versione alla stesura del paragrafo su NO e malattie metaboliche, qui ripresentato in forma lievemente rivista.

La cascata dell'acido arachidonico

Carlo Patrono, Paola Patrignani

Obiettivi formativi

- Comprendere le basi molecolari della biosintesi dei mediatori lipidici derivati dall'acido arachidonico
- Approfondire la biologia dei diversi enzimi coinvolti nella sintesi degli eicosanoidi
- Acquisire le conoscenze di base sulla funzione dei recettori degli eicosanoidi e come la loro attivazione si traduca nelle diverse risposte funzionali
- Acquisire le conoscenze di base della farmacodinamica delle principali classi di farmaci utilizzati per inibire la sintesi degli eicosanoidi o per bloccarne la funzione

Gli eicosanoidi fanno parte della famiglia degli autacoidi, cioè di sostanze liberate da una cellula nell'ambiente extracellulare dove poi inducono risposte biologiche interagendo con recettori specifici presenti sulla stessa cellula generatrice e/o su altre cellule nelle immediate vicinanze della sede di produzione. Gli eicosanoidi rappresentano, quindi, una classe di mediatori della comunicazione intercellulare a breve distanza. Questo è dovuto sia alla instabilità chimica di alcuni eicosanoidi che alla presenza in vivo di sistemi enzimatici capaci di metabolizzare e inattivare rapidamente i composti biologicamente attivi. Diversamente dai classici neurotrasmettitori che sono sintetizzati in continuo e che vengono concentrati in vescicole sinaptiche, gli eicosanoidi sono sintetizzati in seguito all'interazione di stimoli di diversa natura con la membrana cellulare e diffondono immediatamente nell'ambiente extracellulare.

Gli eicosanoidi si formano a partire di acido arachidonico, un acido grasso essenziale che contiene 4 doppi legami (acido 5,8,11,14-eicosatetraenoico), esterificato nella seconda posizione del glicerolo di 3 principali fosfolipidi di membrana: il *fosfatidil inositolo*, la *fosfatidil colina* e la *fosfatidil etanolamina*. Dato che la concentrazione di acido arachidonico libero nelle cellule è molto bassa, la biosintesi degli eicosanoidi dipende principalmente dalla capacità delle cellule di liberare il precursore dalle membrane in seguito a stimoli di varia natura. L'acido arachidonico può essere poi trasformato in un numero rilevante di sostanze biologicamente attive attraverso reazioni ossidative catalizzate da enzimi specifici o da radicali dell'ossigeno. Sono state identificate almeno quattro serie di derivati biologicamente attivi (Figura 44.1): 1. i *prostanoidi*, cioè i

prodotti dell'azione dell'enzima prostaglandina H sintasi (PGHS); 2. gli *acidi idrossieicosatetraenoici (HETE)* e i *leucotrieni (LT)*, prodotti per l'azione di diverse lipossigenasi (la 5-, la 12- e la 15-lipossigenasi); 3. gli *acidi epossieicosatetraenoici* e gli *acidi idrossieicosatetraenoici*, formati attraverso l'azione di enzimi che contengono il citocromo P450; 4. gli *iso-eicosanoidi*, una serie di composti simili agli eicosanoidi (*isoprostani*, *isotrombossani*, *isoleucotrieni* e *isoHETE*) prodotti attraverso perossidazione lipidica catalizzata da radicali dell'ossigeno. Gli eicosanoidi prodotti e liberati in vivo subiscono un'intensa degradazione enzimatica che porta alla formazione di metaboliti biologicamente inattivi che vengono eliminati nelle urine. Le reazioni di ossidazione – enzimatiche e non – degli acidi grassi polinsaturi, quali l'acido arachidonico, si trovano al centro di meccanismi locali di regolazione (Tabella 44.1) che riguardano i processi infiammatori e immunitari, l'emostasi e la trombosi, la reattività bronchiale, la funzione renale, la riproduzione, la citoprotezione gastrica, l'apoptosi delle cellule epiteliali intestinali e la funzione vascolare. La modulazione farmacologica o dietetica di queste reazioni può avere pertanto conseguenze cliniche complesse, favorevoli e sfavorevoli, non sempre prevedibili nel singolo paziente.

Liberazione dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana

L'acido arachidonico esterificato nei fosfolipidi di membrana può essere liberato in seguito all'interazione di stimoli di diversa natura con la membrana cellulare:

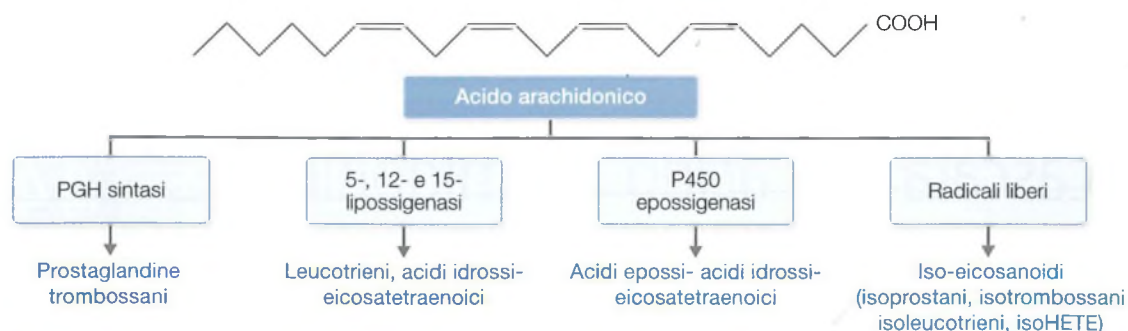


FIGURA 44.1 Principali vie metaboliche dell'acido arachidonico. L'acido arachidonico viene metabolizzato attraverso almeno quattro vie principali: 1. la via della prostaglandina H sintasi (PGH sintasi) che porta alla formazione di prostanoidi; 2. la via delle lipossigenasi (5-, 12- e 15-lipossigenasi) che porta alla formazione degli acidi idrossieicosatetraenoici e dei leucotrieni; 3. la via che porta alla formazione di acidi epossieicosatetraenoici che è catalizzata da enzimi che contengono il citocromo P450; 4. la via della perossidazione lipidica non enzimatica che è catalizzata dai radicali dell'ossigeno e porta alla formazione di iso-eicosanoidi. Le prime tre vie d'ossidazione enzimatica operano sull'acido arachidonico libero, mentre la perossidazione non enzimatica avviene sull'acido arachidonico esterificato.

1. stimoli fisiologici (istamina, bradichinina, vasopressina, angiotensina II, interleuchina-1, fattori di crescita, proteasi come la trombina);
2. stimoli fisici (*shear stress*, ischemia);
3. agenti farmacologici (ionoforo del calcio A23187, esteri del forbole come il PMA).

Gli stimoli fisiologici agiscono interagendo con recettori specifici presenti sulla membrana cellulare spesso accoppiati a proteine G. Queste a loro volta attivano alcune fosfolipasi (A₂, C, D) capaci di liberare l'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana.

La fosfolipasi A₂ idrolizza il legame estereo sn-2 della fosfatidilcolina e libera l'acido arachidonico con formazione di 1-acil-fosfatidilcolina. È importante ricordare che l'azione antinfiammatoria dei glucocorticoidi sembra essere dovuta, in parte, alla loro capacità di interferire con questo passaggio del metabolismo dell'acido arachidonico: infatti, questi ormoni inducono l'espressione del gene della lipocortina 1, una proteina capace di inibire la fosfolipasi A₂ legando la fosfatidilcolina.

Recentemente, è stata dimostrata l'esistenza di due diverse fosfolipasi A₂ calcio-dipendenti coinvolte nella liberazione dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana: una fosfolipasi A₂ secretoria (sPL A₂) di 14 kDa che viene rilasciata nell'ambiente extracellulare e causa la liberazione di acidi grassi (tra cui l'acido arachidonico) esterificati nella seconda posizione dei fosfolipidi della membrana plasmatica e una fosfolipasi citosolica (cPLA₂) di 85 kDa specifica per l'acido arachidonico.

Metabolismo enzimatico dell'acido arachidonico

Come illustrato nella figura 44.1, le trasformazioni enzimatiche dell'acido arachidonico coinvolgono l'intervento di PGH sintasi, di lipossigenasi o di enzimi che contengono il citocromo P450. In realtà, le vie metaboliche che hanno maggiore interesse farmacologico sono quelle della PGH sintasi e della 5-lipossigenasi, che perciò saranno le sole a essere trattate in dettaglio.

La via della PGH sintasi

L'enzima è dotato di due distinte attività catalitiche

La seconda tappa nella sintesi dei prostanoidi è rappresentata dalla conversione dell'acido arachidonico a PGH₂ (Figura 44.2). Questa richiede l'intervento di un enzima denominato PGH sintasi, dotato di due attività catalitiche: una ciclossigenasica (COX) che porta alla formazione della PGG₂ e una perossidasica che riduce la PGG₂ a PGH₂. Sono stati caratterizzati due isoenzimi denominati PGH sintasi 1 (PGHS-1 o COX-1) e PGH sintasi 2 (PGHS-2 o COX-2).

La COX-1: un enzima costitutivo

Il gene della COX-1 (circa 22 kb) fa parte dei cosiddetti "house-keeping genes" che sono espressi in modo costitutivo da quasi tutte le cellule dell'organismo umano. Tuttavia, il gene della COX-1 può essere regolato in alcune condizioni quali la differenziazione delle cellule monocitiche, comportandosi così, come un "delayed response gene".

La COX-1 svolge un ruolo importante nella formazione fisiologica dei prostanoidi coinvolti nella comunicazione intercellulare e nell'amplificazione o modulazione locale di funzioni omeostatiche quali quella gastrointestinale, piastrinica e renale (Tabella 44.1).

La COX-1 è una proteina omodimerica integrata nelle membrane cellulari. La proteina con peso molecolare di 72 kDa ha una struttura globulare ed è caratterizzata da tre parti fondamentali: una porzione omologa all'*Epidermal Growth Factor* (EGF), una che serve per il suo ancoraggio alla membrana, e una regione che contiene i due siti catalitici per l'attività ciclossigenasica e perossidasica. I due sono strutturalmente distinti. La struttura tridimensionale dell'enzima di pecora cristallizzato è stata caratterizzata con l'uso dei raggi X (Figura 44.3). Il sito dell'attività ciclossigenasica è formato da un canale idrofobo lungo e stretto. L'ingresso del "canale della ciclo ossigenasi" si trova in prossimità del sito di ancoraggio dell'enzima con la membrana cellulare, in posizione strategica per ricevere il substrato liberato da uno sti-

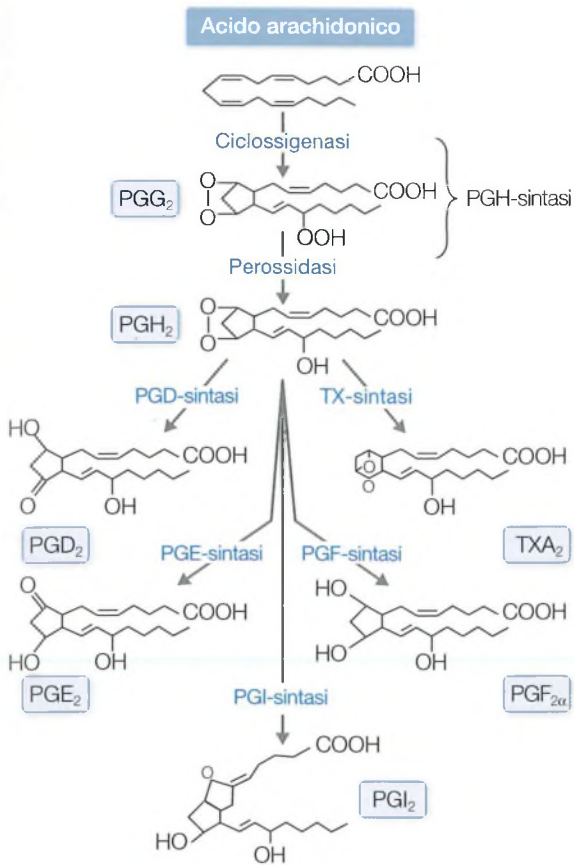


FIGURA 44.2 Via metabolica della PGH-sintasi e formazione di prostanoidi. Le due attività enzimatiche della PGH-sintasi catalizzano la trasformazione dell'acido arachidonico in PGH₂. La PGH₂ viene metabolizzata in trombossano (TXA₂), prostaciclina (PGI₂) e prostaglandine (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}) da specifiche sintasi.

TABELLA 44.1 Attività biologiche dei principali prostanoidi		
Prosta-noidi	Sede di produzione	Risposte biologiche
TXA ₂	Piastrine, polmone, corticale renale	↑ aggregazione e degranulazione piastrinica ↑ tono della muscolatura liscia vasale e bronchiale ↓ flusso ematico renale e filtrazione glomerulare
PGE ₂	Monociti, midollare renale, ipotalamo, timo	↓ tono della muscolatura liscia; secrezione gastrica ↓ liberazione di neurotrasmettitori del SN autonomo ↓ lipolisi negli adipociti ↓ soglia del dolore ↓ diuresi, natriuresi ↑ temperatura corporea ↑ regolazione della differenziazione linfocitaria
PGF _{2α}	Utero, midollare renale, piastrine	↑ tono della muscolatura liscia ↑ luteolisi
PGD ₂	Mastociti, piastrine, cervello	↓ tono della muscolatura liscia vasale ↑ tono della muscolatura liscia bronchiale ↓ aggregazione piastrinica regolazione del sonno
PGI ₂	Vasi, corticale renale	↓ tono della muscolatura liscia vasale ↓ aggregazione piastrinica ↑ flusso ematico renale e filtrazione glomerulare
LTC ₄	Monociti, eosinofili	↑ tono della muscolatura liscia vasale e bronchiale ↑ permeabilità vasale
LTB ₄	Monociti, neutrofilii	↑ aggregazione, degranulazione e chemiotassi dei neutrofilii
8-iso-PGF _{2α}	Membrane cellulari LDL	↑ aggregazione piastrinica ↑ tono della muscolatura liscia vasale ↑ proliferazione delle cellule muscolari lisce

molo. Attraverso tecniche di immunoistochimica, si è dimostrato che l'enzima è localizzato a livello del reticolo endoplasmatico orientato verso il lume del reticolo stesso e a livello perinucleare.

Durante la sua attività ciclossigenasica, la COX-1 subisce una rapida inattivazione attraverso un meccanismo non ancora completamente chiarito. Attraverso questa strategia regolatoria di tipo "suicida", la COX-1 da un lato limita la sua attività indotta dalla liberazione di acido arachidonico, ma allo stesso tempo è in grado di stimolare la sua sintesi de novo adattandosi così alle necessità funzionali della cellula.

■ **La COX-2: un enzima prevalentemente inducibile**

In alcuni tessuti (cervello, testicoli, prostata, rene e vasi) è stata dimostrata l'espressione costitutiva di un secondo tipo di enzima denominato PGH sintasi-2 o COX-2. La proteina è codificata da un gene di circa 8 kb che fa parte degli "immediate early genes", cioè geni che sono rapidamente espressi in risposta a stimoli opportuni e il cui mRNA è altamente instabile per la presenza di sequenze (AUUUA) nella regione 3' non tradotta. La COX-2 mostra una omologia di circa il 60% con la COX-1; tutti i residui

amminoacidici che sono determinanti ai fini delle attività catalitiche della COX-1 sono ben conservati nella COX-2. In condizioni fisiologiche, l'mRNA per la COX-2 è misurabile solo nei tessuti sovraccaricati. Stimoli pro-infiammatori, come IL-1, LPS e fattori di crescita, come il *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), possono causare una rapida e intensa induzione dell'espressione della COX-2 in diversi tipi cellulari, quali i monociti/macrofagi, i fibroblasti e le cellule endoteliali dei vasi. La produzione di prostanoidi che contribuisce alla vasodilatazione, all'edema e all'ipe-algesia caratteristiche dei processi infiammatori è soprattutto conseguenza della induzione locale dell'espressione di COX-2 in cellule infiammatorie. Oltre che nella flogosi, i prostanoidi prodotti attraverso l'attività della COX-2 sembrano essere coinvolti nel controllo di alcuni eventi fisiopatologici attinenti l'area della riproduzione femminile, della funzione renale e della cancerogenesi intestinale. Recentemente è stata caratterizzata una forma variante dell'enzima COX, denominata COX-3. L'mRNA della COX-3 deriva da un differente splicing dell'mRNA della COX-1, infatti l'introne 1 non viene eliminato. Nell'uomo, l'mRNA della COX-3 è espresso come un trascritto di 5,2 kb nella corteccia cerebrale e nel cuore.

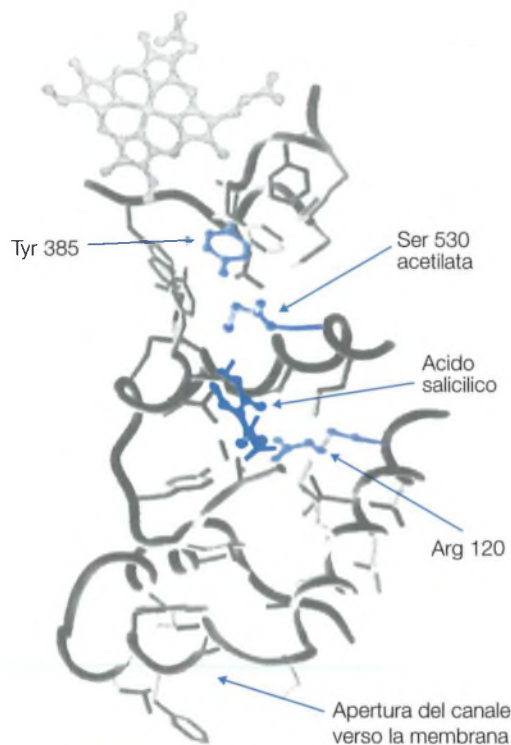


FIGURA 44.3 Struttura del sito attivo ciclossigenasico della COX-1 ovina cristallizzata insieme all'acido acetilsalicilico. Il residuo carbossilico dell'acido salicilico interagisce reversibilmente con l'arginina (Arg) 120, un comune sito di ancoraggio per tutti i FANS. Questo crea un pool locale di residuo acetilante proprio al di sotto della serina (Ser) 530 che spiega l'acetilazione selettiva di questo amminoacido da parte dell'aspirina. La serina 530 acetilata occupa una posizione strategica entro il canale ciclossigenasico direttamente sotto la tirosina (Tyr) 385, un residuo chiave per iniziare la catalisi ciclossigenasica. Così, l'acido arachidonico che diffonde all'interno del canale non è in grado di interagire con la Tyr 385. (Per gentile concessione del Dott. P. L. Loll, Department of Pharmacology, University of Pennsylvania School of Medicine)

Comunque, diversamente dall'animale, la COX-3 non è espressa come proteina funzionale nell'uomo.

L'inibizione dell'attività ciclossigenasica della COX-1 e della COX-2 rappresenta il meccanismo d'azione dei farmaci antinfiammatori non steroidei

I farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) (Tabella 44.2) competono con l'acido arachidonico per il legame a un comune sito di ancoraggio, impedendone, così, la ossidazione a PGG_2 . I FANS non sembrano invece influenzare l'attività perossidasi delle PGH sintasi.

Sia gli effetti terapeutici (tra i quali, quello analgesico, antipiretico e antiflogistico) che molti degli effetti collaterali (ad esempio, le complicità emorragiche gastrointestinali) dei FANS possono essere ricondotti a un comune meccanismo d'azione: l'inibizione della sintesi di prostanoidi catalizzata dalla COX-2 e dalla COX-1, rispettivamente (Tabella 44.3).

I FANS possono essere suddivisi in 3 classi sulla base del loro meccanismo d'interazione con questi enzimi (Tabel-

la 44.4): classe I: meccanismo competitivo semplice (ad esempio, ibuprofene); classe II: meccanismo competitivo tempo-dipendente, lentamente reversibile (ad esempio, indometacina e inibitori selettivi della COX-2); classe III, meccanismo competitivo tempo-dipendente, irreversibile (ad esempio, acido acetilsalicilico).

I FANS della classe I competono reversibilmente con l'acido arachidonico per il legame a un comune sito di ancoraggio (Arg 120) all'interno del canale della ciclo ossigenasi delle PGH sintasi, e formano rapidamente un complesso enzima-inibitore (EI) che è facilmente dissociabile; questo porta a una inibizione equipotente dell'attività ciclossigenasica della COX-1 e della COX-2. Alla classe II appartengono alcuni FANS di uso comune, quali l'indometacina, il flurbiprofene e il diclofenac, e i coxib (rofecoxib, celecoxib, valdecoxib, etoricoxib e lumiracoxib), una famiglia di FANS introdotti in commercio alla fine del secolo scorso, alcuni dei quali sono stati successivamente ritirati per problemi di tossicità cardiovascolare (rofecoxib), cardiovascolare e cutanea (valdecoxib) o epatica (lumiracoxib). Gli inibitori della classe II si legano rapidamente e reversibilmente all'enzima formando complessi EI ma, successivamente, se trattenuti nel sito di ancoraggio dei due isoenzimi per un tempo sufficiente, provocano un cambiamento conformazionale della proteina che porta alla lenta formazione di un complesso relativamente stabile EI*. Una volta legati all'enzima in tal modo, questi inibitori si dissociano dal sito attivo solo molto lentamente. I coxib producono una inibizione reversibile, tempo-dipendente della COX-2, mentre sono inibitori competitivi semplici della COX-1. I coxib sono derivati aril-metil-sulfonilici o aril-metil-sulfonamidici, eccetto il lumiracoxib che è un derivato dell'acido acetico. Gli effetti terapeutici sia dei FANS tradizionali che dei coxib sono riconducibili alla loro azione sulla COX-2, mentre la variabile tossicità sistemica, e specificamente la tossicità gastrointestinale, è da imputarsi principalmente (anche se non esclusivamente) all'azione di questi farmaci sulla COX-1 (Tabella 44.3). Infatti, i risultati di studi clinici randomizzati hanno evidenziato che coxib altamente selettivi (ad esempio, rofecoxib e lumiracoxib) hanno una migliore tollerabilità e sicurezza gastrointestinale rispetto ai FANS tradizionali. È importante tenere presente che la selettività nei confronti della COX-2 rappresenta una variabile continua, con un discreto grado di sovrapposizione tra alcuni coxib (ad esempio, celecoxib) e alcuni FANS tradizionali (ad esempio, nimesulide e diclofenac) (Figura 44.4). Allo scopo di limitare la tossicità gastrointestinale e cardiovascolare dei FANS, mantenendo la loro efficacia analgesica e antinfiammatoria, sono stati sviluppati alcuni inibitori della COX in grado di rilasciare ossido di azoto (NO) (COX inibitori donatori di NO, CINOD). Il naproxinod [(S)-2-(6-metossi-2-naftil) acido propanoico 4-nitrossibutil estere] è il primo composto appartenente alla classe dei CINOD sviluppato per il trattamento dei segni e sintomi dell'osteoartrite. Naproxinod ha mostrato un'efficacia clinica comparabile al naprossene, ma, rispetto a questo, ha un minore impatto sulla pressione arteriosa, in pazienti con osteoartrite. Tuttavia, gli studi

TABELLA 44.2 Meccanismo d'azione e usi terapeutici delle principali classi chimiche di farmaci antinfiammatori non steroidei

Classe chimica	Nome generico	Principali usi terapeutici	Meccanismo d'azione
Salicilati	Acido salicilico Diflunisal Acido acetilsalicilico (ASA o aspirina)	<i>Analgesico</i> : affezioni infiammatorie dell'apparato muscoloscheletrico, sindromi dolorose vertebrali e cervicali, nevralgie, sciatalgie, radicoliti, nevralgie cervicobrachiali e trigeminali, cefalee ed emicranie, mal di denti, affezioni neoplastiche, sindromi dolorose post-traumatiche e postoperatorie, dismenorrea, sintomi influenzali e da raffreddamento <i>Antinfiammatorio</i> : reumatismo articolare acuto, artrite reumatoide <i>Antiaggregante piastrinico</i> (l'acido acetilsalicilico ma non l'acido salicilico)	Acido salicilico: debole inibitore di COX-1 e COX-2; alte concentrazioni in vitro inibiscono l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B; ASA: inibitore irreversibile della COX-1 e COX-2; in vitro risulta più potente verso la COX-1 rispetto alla COX-2
Derivati pirazolonic	Fenilbutazone Aminopirina Sulfipirazone	<i>Antinfiammatorio</i> : artrite reumatoide e malattie del collagene <i>Antipiretico-analgesico</i> : sintomatologia del raffreddore e sindromi influenzali <i>Antiaggregante piastrinico, uricosurico</i> (sulfipirazone)	Deboli inibitori della COX-1 e della COX-2
Derivati para-aminofenolici	Acetaminofene o paracetamolo	<i>Antipiretico, analgesico ma con debolissima attività antinfiammatoria</i> (è usato come sostituto dell'ASA o in associazione a esso)	Debole inibitore della COX-1 e della COX-2
Derivati dell'acido propionico	Fenoprofene Flurbiprofene Ibuprofene Chetoprofene Naproxen Oxaprozin	<i>Antinfiammatorio</i> : antireumatico nell'artrite reumatoide, osteoartrite, periartriti, lombalgie, sciatalgie e radicolonevriti, fibrosi, miositi, tenosinoviti <i>Analgesico</i> : in varie forme dolorose (tra cui la dismenorrea e la cefalea) <i>Antipiretico</i>	Inibitori non selettivi della COX-1 e della COX-2
Derivati dell'acido acetico	Diclofenac sodico Etodolac Indometacina Chetorolac Nabumetone (<i>pro-farmaco, metabolita attivo: acido 6-metossi-2-naftilacetico</i>) Sulindac (<i>pro-farmaco; metabolita attivo: sulindac solfuro</i>) Tolmetina	<i>Antinfiammatorio</i> : artrite reumatoide e osteoartrite <i>Analgesico-antipiretico</i>	Inibitori non selettivi della COX-1 e della COX-2 Diclofenac ed etodolac: inibitori preferenziali della COX-2
Fenamati (acidi antranilici)	Meclofenamato sodico Acido mefenamico Acido flufenamico	<i>Antinfiammatorio</i> <i>Analgesico</i> : malattie reumatiche, affezioni dell'apparato muscolo-scheletrico e dismenorrea <i>Antipiretico</i>	Inibitori non-selettivi della COX-1 e della COX-2
Oxicam derivati	Piroxicam Cinnoxicam Droxicam Tenoxicam Meloxicam	<i>Antinfiammatorio</i> : artrite reumatoide e osteoartrite <i>Analgesico-antipiretico</i>	Inibitori non selettivi della COX-1 e della COX-2 Meloxicam: inibitore preferenziale della COX-2
Derivati dell'acido butirrico	Indobufene	<i>Antiaggregante piastrinico</i>	Inibitore preferenziale della COX-1
Sulfonanilide derivati	Nimesulide	<i>Antinfiammatorio</i> : artrite reumatoide e osteoartrite <i>Analgesico-antipiretico</i>	Inibitore preferenziale della COX-2
Coxib	Celecoxib Rofecoxib Valdecoxib Etoricoxib Lumiracoxib	<i>Antinfiammatorio</i> : artrite reumatoide e osteoartrite <i>Analgesico-antipiretico</i>	Inibitori selettivi della COX-2

TABELLA 44.3 Dipendenza dall'inibizione di COX-1/COX-2 dei principali effetti collaterali dei FANS

Effetti	COX-1	COX-2
Tossicità gastrointestinale	✓	✓
Nefrotossicità	✓	✓
Complicanze emorragiche	✓	-
Interazioni farmacodinamiche con farmaci antipertensivi	✓	✓
Interazioni farmacodinamiche con l'aspirina	✓	?

finora condotti non sono stati giudicati sufficienti dalla agenzia regolatoria dei farmaci.

L'acido acetilsalicilico (aspirina) è il solo FANS conosciuto, appartenente alla classe III, che modifichi irreversibilmente la COX-1 e la COX-2 attraverso un processo di acetilazione. L'aspirina si lega inizialmente all'Arg 120 con bassa affinità. Quando legata in questa posizione, l'aspirina trasferisce il suo gruppo acetile a uno specifico residuo di serina situato sopra l'Arg 120 (Figura 44.3).

TABELLA 44.4 Classificazione dei farmaci antinfiammatori non steroidei in base al meccanismo d'inibizione delle PGH-sintasi

Classe I. Meccanismo competitivo semplice	
Ibuprofene Piroxicam Sulindac solfuro Naproxen Acido-6 metossi-2-naftil acetico (6-MNA) Acido flufenamico Acido mefenamico	$E+I \rightleftharpoons EI$
Classe II. Meccanismo competitivo tempo-dipendente, lentamente reversibile	
Indometacina Flurbiprofene Acido meclofenamico Diclofenac DuP 697 NS-398 Rofecoxib Celecoxib Valdecoxib Etoricoxib Lumiracoxib	$E+I \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons EI^*$
inibitori selettivi della PGHS-2	
Classe III. Meccanismo competitivo tempo-dipendente, irreversibile	
Acido acetilsalicilico	$E+I \rightleftharpoons EI \rightarrow EI^*$

E: enzima
I: inibitore
EI: complesso enzima-inibitore rapidamente reversibile
EI*: complesso enzima-inibitore lentamente reversibile o irreversibile
Da: Smith WL, DeWitt DL. Semin Nephrol 1995;15:179-94.

Nella COX-1 umana è la serina in posizione 529 che viene acetilata, mentre nella COX-2 è la serina 516. Sebbene il salicilato di per sé non sia un inibitore efficiente dell'attività dei due isoenzimi, se somministrato in vivo, possiede un effetto antinfiammatorio il cui meccanismo non è stato ancora chiarito. Studi in vitro hanno evidenziato come il farmaco a concentrazioni millimolari sia

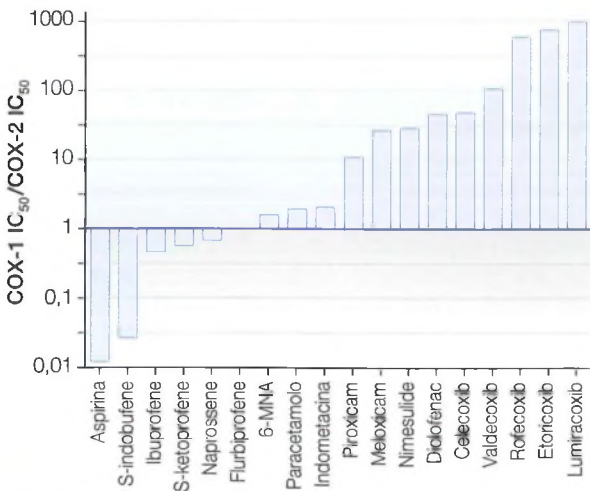


FIGURA 44.4 COX-2 selettività come variabile continua. Il rapporto tra la IC₅₀ per l'inibizione della COX-1 piastrinica e la IC₅₀ per l'inibizione della COX-2 monocitaria rappresenta una misura della variabile COX-2 selettività di FANS tradizionali e coxib.

capace d'inibire l'attivazione di proteine regolatrici della trascrizione di geni normalmente espressi nelle risposte infiammatorie, come l'NF-κB.

L'inibizione irreversibile della COX-1 piastrinica da parte dell'aspirina è di notevole interesse farmacologico e clinico (vedi CD: Approfondimento 44.1. *Meccanismo d'azione dell'aspirina come farmaco antitrombotico*). Studi di mutagenesi sito-specifica e cristallografici della COX-1 hanno dimostrato che la Ser-529 non è importante per l'attività catalitica dell'enzima, ma che la sua acetilazione ostruisce il canale della ciclo ossigenasi nel suo punto più stretto, impedendo l'accesso del substrato alla tirosina 385 posta all'apice del canale (Figura 44.3).

La durata dell'effetto inibitorio dell'aspirina dipende in parte da motivi farmacocinetici (breve emivita del farmaco) e in parte dalla velocità con cui la cellula è in grado di sintetizzare PGH-sintasi de novo (poche ore, nel caso di cellule nucleate). Questo spiega la diversa durata degli effetti farmacologici dell'aspirina: alcune ore, nel caso degli effetti analgesico, antipiretico e antiflogistico (in funzione della risintesi di COX-2), almeno 24 ore nel caso dell'effetto antiaggregante piastrinico (in funzione del turn-over piastrinico).

Metabolismo degli endoperossidi ciclici

La trombassano sintasi trasforma la PGH₂ in trombassano A₂

La trombassano sintasi (TX-sintasi) è una emoproteina di membrana. Come nelle P450-mono-ossigenasi, il gruppo eme è legato al gruppo tiolato di un residuo di cisteina. La TX-sintasi mostra una bassa omologia (solo il 16%) con altre P450-mono-ossigenasi e fa quindi parte di una nuova sottofamiglia chiamata CYP5. L'enzima catalizza la conversione della PGH₂ a trombassano A₂ (TXA₂; Figura 44.2). La formazione di TXA₂ da PGH₂ è sempre accompagnata dalla formazione di una quantità equivalente di un idrossiacido a 17 atomi di carbonio (HHT) e malondialdeide (MDA). L'HHT non svolge alcuna attività biologica. L'espressione della TX-sintasi può essere indotta dagli esteri del forbolo e dal desametazone.

Come per altri enzimi del metabolismo dell'acido arachidonico, questo enzima subisce una inattivazione "suicida" irreversibile durante la sua attività catalitica. La perdita di attività è proporzionale alla quantità di substrato trasformato in TXA₂. Questo fenomeno sembra essere di notevole importanza per il controllo della biosintesi di TXA₂. La TX-sintasi può essere inibita selettivamente da composti analoghi dell'imidazolo, derivati piridinici o da analoghi degli endoperossidi prostaglandinici. L'inibizione della TX-sintasi può portare all'accumulo della PGH₂; questo determina un aumento della biosintesi di PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α} nelle piastrine e di PGI₂ nel tessuto vascolare. Nelle piastrine attivate, l'accumulo di PGH₂ che segue all'inibizione della TX-sintasi può causare l'occupazione e l'attivazione del recettore piastrinico del TXA₂; ciò potrebbe spiegare gli scarsi effetti inibitori sulla funzione piastrinica associati alla somministrazione

di inibitori della TX-sintasi nell'uomo. Questi inibitori sono in grado di ridurre il deterioramento della funzione renale in alcuni modelli animali di danno glomerulare progressivo e riducono la mortalità nel modello murino di nefrite lupica.

La prostaglandina F sintasi trasforma la PGH₂ in PGF_{2α}

La prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e i suoi derivati sono formati dalla PGH₂ attraverso la riduzione di 2 elettroni (Figura 44.2). Le vie metaboliche attraverso le quali le cellule sono in grado di sintetizzare PGF_{2α} e suoi derivati sono molteplici: a) riduzione della PGH₂ a PGF_{2α} attraverso l'azione di un endoperossido-reduttasi; b) riduzione della PGH₂ a formare la 9α,11β-PGF_{2α} tramite l'azione di una 9-cheto-reduttasi; c) riduzione della PGE₂ a PGF_{2α} a opera di una 9-cheto-reduttasi.

PGF_{2α} svolge un ruolo importante nella fisiopatologia della contrazione uterina, e la sua aumentata produzione al termine della gravidanza contribuisce ad avviare e sostenere il parto. Analoghi strutturali della PGF_{2α} metabolicamente stabili (ad esempio, 15-metil-PGF_{2α} o carboprost) vengono impiegati come sostanze ossitociche.

La prostaglandina I sintasi genera prostaciclina

La prostaciclina (PGI₂), una sostanza antiaggregante e vasodilatatrice prodotta principalmente dal tessuto vascolare, si forma per l'azione dell'enzima prostaglandina I sintasi (PGI-sintasi; Figura 44.2). Come la TX-sintasi, la PGI-sintasi fa parte della famiglia delle P450-monoossigenasi. La PGI-sintasi appartiene a una nuova sottofamiglia denominata CYP8. L'enzima umano è costituito di 500 amminoacidi con un peso molecolare di 57 kDa. È un enzima associato con la membrana nucleare, con quella del reticolo endoplasmatico e della membrana plasmatica. L'enzima subisce inattivazione "suicida" durante la sua attività catalitica.

La PGI₂ prodotta dall'endotelio vascolare contribuisce, insieme ad altre sostanze di origine endoteliale, alla "tromboresistenza" della superficie intima e al controllo del tono vascolare. Inoltre, la PGI₂ aumenta l'attività degli enzimi che metabolizzano gli esteri del colesterolo nelle cellule della muscolatura liscia, inibisce l'accumulo di esteri del colesterolo nei macrofagi e previene la liberazione di alcuni fattori di crescita.

Quantunque le attività biologiche della PGI₂ siano compatibili con un ruolo protettivo di questo prostanoidi nei confronti del processo aterotrombotico, la mancanza di inibitori selettivi della PGI-sintasi non ha consentito di testare sperimentalmente questa ipotesi. Peraltro, la delezione genica del recettore della PGI₂ (IP) aumenta la suscettibilità del topo alla trombosi arteriosa. Numerose recenti evidenze sperimentali e cliniche hanno dimostrato che la prostaciclina, prodotta a livello vascolare principalmente attraverso la COX-2, rappresenta un importante mediatore ateroprotettivo e anti-trombotico, la cui inibizione da parte dei FANS tradizionali e dei coxib si associa a un moderato aumento del rischio di eventi cardiovascolari (soprattutto coronarici).

La PGI₂ è rapidamente metabolizzata in vivo (emivita plasmatica nell'uomo: 3-5 minuti); per questo motivo sono stati sviluppati degli analoghi chimicamente e metabolicamente più stabili del composto naturale. Alcuni di questi (ad esempio, l'iloprost) sono stati utilizzati in studi clinici controllati e si sono dimostrati efficaci nel trattamento delle vasculopatie periferiche.

La prostaglandina D sintasi trasforma la PGH₂ in PGD₂

La prostaglandina D₂ (PGD₂) si forma attraverso un riarrangiamento non ossidativo della PGH₂ (Figura 44.2). Sebbene il ruolo fisiologico della PGD₂ non sia ancora definito, è stato dimostrato che la PGD₂ è un inibitore della funzione piastrinica, rilassa la muscolatura liscia vasale, causa broncocostrizione e sembra essere coinvolta nell'induzione del sonno (Tabella 44.1). Due diverse proteine con attività PGD-sintasi sono state caratterizzate: la PGD-sintasi tipo lipocalina (L-PGD-sintasi) e la PGD-sintasi ematopoietica (H-PGD-sintasi). Queste due proteine non hanno omologia e svolgono due diverse funzioni. La L-PGD-sintasi è espressa nelle cellule endoteliali in risposta allo shear-stress, suggerendo un suo possibile ruolo ateroprotettivo. La H-PGD-sintasi, un enzima che richiede glutatione, è principalmente espressa nelle cellule che presentano l'antigene, mastociti e megacarioblasti. Inoltre, l'albumina sembra essere in grado di catalizzare la conversione non enzimatica di PGH₂ in PGD₂.

La prostaglandina E sintasi trasforma la PGH₂ in PGE₂

Il riarrangiamento non ossidativo della PGH₂ a PGE₂ (Figura 44.2) può avvenire sia non enzimaticamente che enzimaticamente attraverso l'azione delle PGE-sintasi. Sono state identificate PGE-sintasi localizzate nel compartimento microsomiale e in quello citosolico, denominate mPGE-sintasi e cPGE-sintasi, rispettivamente. Sono stati caratterizzati due diversi tipi di mPGE-sintasi: mPGE-sintasi 1 e 2. La mPGE-sintasi 1 è indotta in risposta a stimoli proinfiammatori, ma può essere espressa in modo costitutivo in alcuni tessuti, quali il rene, l'ovaio e la vescica. Una sua espressione coordinata con la COX-2 è stata dimostrata in diversi tipi cellulari, quali i macrofagi e linee cellulari di tumore polmonare. La mPGE-sintasi 2, una proteina di 33 kDa con attività glutatione-dipendente, è costitutivamente espressa in diversi tessuti e produce PGE₂ dalla PGH₂ originata sia dalla COX-1 che dalla COX-2. Recentemente, è stata evidenziata la sua espressione nel cancro del colon-retto umano. La cPGE-sintasi, una proteina costitutiva e ubiquitaria identica alla p23 associata alla proteina dello shock termico di 90 kDa, sembra promuovere la sintesi rapida di PGE₂ mediata dalla COX-1.

La PGE₂ così prodotta svolge molteplici attività in diversi tessuti: essa sembra potenziare l'effetto pro-aggregante di altri agonisti piastrinici, possiede attività vasodilatatrice e antiproliferativa, causa iperalgesia ed edema se prodotta in eccesso. La PGE₂ (dinoprostone) e analoghi strutturali della PGE₁ (ad esempio, misoprostolo) sono impiegati

nella citoprotezione gastrica e nell'induzione dell'aborto. Attualmente, sono in fase di sviluppo preclinico alcuni composti che agiscono come inibitori selettivi della mPGES-1. Il razionale del loro sviluppo è quello di avere un farmaco con un'azione analgesica e antinfiammatoria (attraverso l'inibizione della sintesi di PGE₂) che sia meglio tollerato a livello cardiovascolare, rispetto a un FANS tradizionale e un coxib. Infatti, questi composti non dovrebbero inibire la sintesi vascolare di prostaciclina, ma al contrario potrebbero causarne un aumento per la possibile ridirezione del metabolismo di PGH₂.

La via delle lipossigenasi

La 5-lipossigenasi trasforma l'acido arachidonico in leucotrieni

La 5-lipossigenasi converte l'acido arachidonico nell'acido 5-idroperossieicosatetraenoico (5-HPETE) che è instabile e si trasforma, sia enzimaticamente tramite una perossidasi che non-enzimaticamente, in acido 5-idrossieicosatetraenoico (5-HETE). La 5-lipossigenasi ha anche una seconda attività catalitica responsabile della conversione del 5-HPETE in leucotriene (LT)_{A₄}, un epossido instabile (Figura 44.5).

Il LTA₄ viene quindi metabolizzato enzimaticamente a produrre due classi di sostanze biologicamente attive, il LTB₄ e i leucotrieni sulfidopeptidici (LTC₄, LTD₄ e LTE₄). Il LTB₄ è una potente sostanza chemiotattica per

i neutrofili. I leucotrieni sulfidopeptidici sono potenti sostanze costrittrici per la muscolatura liscia vascolare e bronchiale; inoltre essi modulano la produzione di muco, la permeabilità vascolare e l'iper-reattività bronchiale. Per queste attività biologiche, i leucotrieni sulfidopeptidici possono svolgere un ruolo importante nella fisiopatologia dell'asma bronchiale.

La 5-lipossigenasi, una proteina di 78 kDa, è presente nelle cellule ematiche della serie bianca e in altri tipi cellulari. In cellule non stimolate, l'enzima può essere associato alle membrane cellulari oppure libero nel citoplasma. In seguito ad attivazione cellulare, la [Ca²⁺]_i aumenta e l'acido arachidonico, liberato principalmente dall'attività della fosfolipasi citosolica, è trasferito alla 5-lipossigenasi dalla proteina di membrana denominata FLAP (proteina attivante la 5-lipossigenasi) (Figura 44.6). La FLAP è una proteina di 18 kDa che lega l'acido arachidonico. In alcuni tipi cellulari, quali i neutrofili ematici e i macrofagi peritoneali, l'attivazione cellulare porta alla localizzazione perinucleare sia della 5-lipossigenasi che della FLAP. Mentre la FLAP è localizzata a livello della membrana nucleare anche in cellule non attivate, la 5-lipossigenasi trasloca dal citosol al nucleo solo in risposta alla stimolazione cellulare. L'attività catalitica della 5-lipossigenasi richiede la presenza di calcio e di ATP. Come per molti altri enzimi del metabolismo dell'acido arachidonico, la 5-lipossigenasi subisce un'inattivazione "suicida" durante la sua attività catalitica.

Inibitori della 5-lipossigenasi

L'attività catalitica della 5-lipossigenasi può essere inibita da diverse categorie di composti.

1. Composti cosiddetti "redox" (fenidone e suoi analoghi, come il BW755c). Sembrano agire riducendo l'enzima (probabilmente riducendo il gruppo ferrico a livello del sito attivo), generando così intermedi radicalici che potrebbero causare alterazioni più o meno permanenti di varie proteine tra cui la 5-lipossigenasi.
2. Composti capaci di interagire con il ferro presente nel sito attivo dell'enzima (derivati dell'acido idrossiamico, ad esempio il zileuton).
3. Inibitori non-redox che interagiscono specificamente con il sito attivo dell'enzima (derivati del metossitetraidropirano, ad esempio, ICI 211,965 e ZD 2138).
4. Inibitori della FLAP. Questi composti non inibiscono direttamente l'attività dell'enzima, ma legandosi alla FLAP interferiscono con il trasferimento dell'acido arachidonico dalla FLAP alla 5-lipossigenasi (Figura 44.6) (ad esempio, MK-0591 e Bayx1005). I nuovi inibitori della FLAP, tra cui AM-103 e GSK-2.190.915, sono attualmente in fase II per il trattamento di malattie infiammatorie, tra cui l'asma.

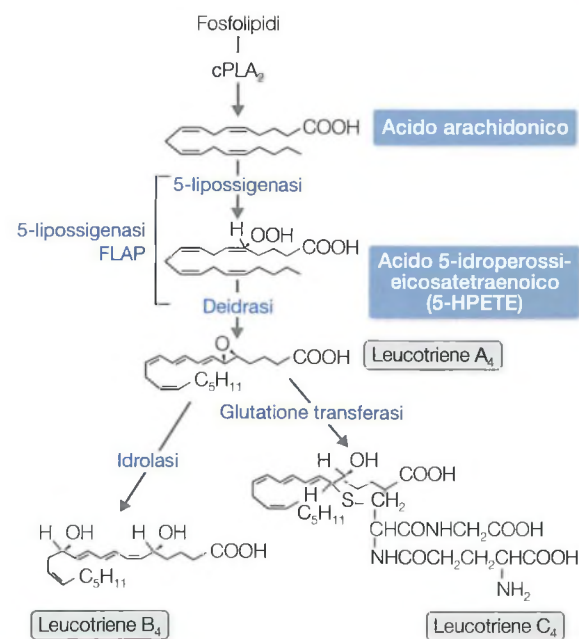


FIGURA 44.5 Via metabolica della 5-lipossigenasi e formazione di leucotrieni. La 5-lipossigenasi possiede due attività catalitiche: quella ossigenasica porta alla formazione di acido 5-idroperossieicosatetraenoico (5-HPETE) a partire dall'acido arachidonico; quella deidrasica (LTA₄-sintasi) trasforma il 5-HPETE in LTA₄, un epossido instabile. Il LTA₄ può essere trasformato in LTB₄ (acido 5,12-diidrossieicosatetraenoico) dall'enzima LTA₄-idrolasi o venire coniugato al glutatone a formare LTC₄.

L'inibitore della 5-lipossigenasi Zileuton ha raggiunto la commercializzazione. Esso potrebbe avere dei vantaggi sugli inibitori recettoriali dei singoli leucotrieni in quanto blocca la sintesi di tutti i prodotti che originano dalla lipossigenasi, anche se le evidenze cliniche di una maggiore efficacia non sono ancora raggiunte. È impiegato

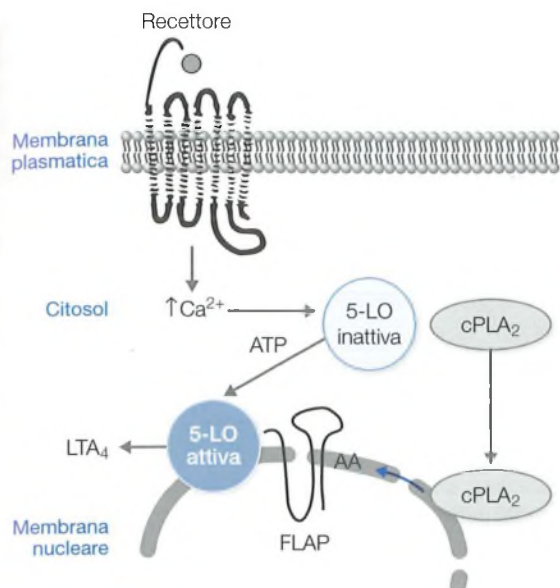


FIGURA 44.6 Attivazione della 5-lipossigenasi. In seguito ad attivazione cellulare, i livelli di calcio libero citosolico aumentano, causando la traslocazione dal citosol alla membrana nucleare della fosfolipasi A₂ citosolica (cPLA₂) e della 5-lipossigenasi (5-LO). Nella membrana nucleare è localizzata la FLAP che lega l'acido arachidonico, (AA) liberato dai fosfolipidi di membrana dalla cPLA₂ attivata, e lo dona al 5-LO che a sua volta lo trasforma in leucotriene A₄ (LTA₄).

nel trattamento dell'asma e ci sono indicazioni che sia utile in altre patologie infiammatorie. Tuttavia, l'uso di questo farmaco si associa ad alterazioni neuropsichiche e comportamentali, anche gravi. Altri inibitori della 5-lipossigenasi sono attualmente studiati per possibili indicazioni in ambito cardiovascolare.

Metabolismo dell'acido arachidonico da parte delle 12- e 15-lipossigenasi

Gli enzimi 12- e 15-lipossigenasi convertono l'acido arachidonico in 12- e 15-HETE, rispettivamente; gli idroperossiacidi vengono poi trasformati non enzimaticamente nei rispettivi idrossiacidi.

I prodotti della 12-lipossigenasi possiedono attività chemiotattica nei confronti dei neutrofili e sono in grado di indurre la migrazione delle cellule muscolari vasali. Non si conosce molto del ruolo dei prodotti diretti della 15-lipossigenasi, che vengono generati soprattutto nei bronchi, in particolare in individui asmatici. È tuttavia interessante il fatto che l'azione coordinata di 5- e 15-lipossigenasi porti alla formazione delle lipossine (LXA₄, cioè acido 5,6,15-triidrossi-7,9,11,13-eicosatetraenoico e LXB₄, acido 5,14,15-triidrossi-6,8,10,12-eicosatetraenoico). Le lipossine svolgono azioni biologiche su vari sistemi; ad esempio, attivano i leucociti, contraggono la muscolatura liscia bronchiale e rilassano quella vasale. L'acetilazione della serina 516 della COX-2 umana da parte dell'aspirina non inibisce completamente l'attività ciclossigenasica dell'enzima ma modifica la sua attività catalitica con conseguente produzione di acido 15R-

idrossieicosatetraenoico (15R-HETE) anziché PGG₂. Esso può venire metabolizzato dalla 5-lipossigenasi a formare una nuova serie di eicosonoidi biologicamente attivi, le 15-epi-lipossine (15-epi-LXA₄ e 15-epi-LXB₄), potenti inibitori dell'adesione e della proliferazione cellulare.

Le lipossine e le 15-epi-lipossine sono mediatori lipidici che svolgono azioni antinfiammatorie attraverso l'induzione dei meccanismi coinvolti nella risoluzione della risposta infiammatoria. Sono stati identificati nuovi mediatori lipidici, le resolvine e le protettine, generati da vie enzimatiche attivate durante la fase di risoluzione dell'infiammazione, a partire da acidi grassi omega-3, cioè l'acido eicosapentaenoico e l'acido docosaesaenoico, rispettivamente. Le resolvine possiedono attività antinfiammatoria e di immunoregolazione; in particolare, controllano l'infiltrazione dei leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN) e promuovono la risoluzione dell'infiammazione. Tra le varie attività biologiche svolte, le protettine bloccano la migrazione dei PMN, inibiscono la secrezione di TNFα e interferone, mentre stimolano la liberazione di citochine antinfiammatorie.

Metabolismo dell'LTA₄

La leucotriene A₄ idrolasi trasforma LTA₄ in LTB₄

A differenza della 5-lipossigenasi che è distribuita selettivamente nelle cellule del tessuto mieloide, la LTA₄-idrolasi è presente in tipi cellulari diversi (leucociti, eritrociti, tessuto renale). Questo enzima è una zinco-peptidasi che catalizza l'idrolisi di una molecola di LTA₄ portando alla formazione di LTB₄, un leucotriene diidrossilico (Figura 44.5), dotato di potente attività chemiotattica per i PMN. Anche questo enzima subisce una inattivazione "suicida" durante l'attività catalitica, perdendo entrambe le attività enzimatiche.

Pochi inibitori specifici della LTA₄-idrolasi sono stati sintetizzati e caratterizzati. Sia gli analoghi dell'LTA₄ (LTA₃ e LTA₅) che l'acido eicosapentaenoico non esterificato sono inibitori della conversione di LTA₄ a LTB₄. La bestatina è un inibitore delle aminopeptidasi, capace di inibire anche l'attività idrolasica dell'enzima.

La leucotriene C₄ sintasi trasforma LTA₄ in LTC₄

La LTC₄-sintasi è un enzima microsomiale che trasferisce il glutatione sulla molecola del LTA₄ portando alla formazione di LTC₄ (Figura 44.5), una potente sostanza costrittrice per la muscolatura liscia vascolare e bronchiale. La LTC₄-sintasi fa parte della famiglia delle glutatione-S-transferasi ed è ampiamente distribuita in vari tessuti, compreso l'endotelio e la muscolatura liscia vasale.

Alcuni inibitori del sistema glutatione-S-transferasico epatico (l'acido etacrinico, l'acido caffeico e l'acido fenilico) possono inibire l'attività della LTC₄-sintasi in vitro. Una limitazione allo sviluppo di inibitori selettivi della LTC₄-sintasi è rappresentato dal possibile accumulo di LTA₄ che potrebbe essere utilizzato dall'enzima LTA₄-idrolasi per formare maggiori quantità di LTB₄.

Metabolismo transcellulare di PGH_2 ed LTA_4

La PGH_2 e il LTA_4 , vengono in parte liberati nell'ambiente extracellulare e possono essere utilizzati da altre cellule per formare eicosanoidi biologicamente attivi (Figura 44.7). La sintesi di prostaciclina può derivare dalla cooperazione cellulare delle piastrine con le cellule endoteliali e i linfociti. Inoltre, è stato dimostrato che piastrine umane, nelle quali l'attività della COX-1 sia soppressa dal trattamento con aspirina, possono recuperare la capacità di sintetizzare TXA_2 in presenza di cellule endoteliali che esprimano COX-2 (scarsamente sensibile a basse concentrazioni di aspirina). Questo avviene perché la PGH_2 prodotta dall'attività della COX-2 delle cellule endoteliali può essere utilizzata dalla TX-sintasi delle piastrine per formare TXA_2 . Questa biosintesi transcellulare di TXA_2 potrebbe contribuire alla cosiddetta "resistenza" all'aspirina, descritta in alcuni pazienti in trattamento con basse dosi di aspirina come antiaggregante piastrinico.

Il LTA_4 prodotto dai PMN può essere utilizzato dagli eritrociti che possiedono attività LTA_4 -idrolasica per formare LTB_4 . Nello stesso modo, le cellule endoteliali e le piastrine che non possiedono attività 5-lipossigenasica, possono utilizzare il LTA_4 liberato dai neutrofili e trasformarlo in LTC_4 tramite l'azione di una loro glutatione-transferasi.

Metabolismo non enzimatico dell'acido arachidonico

Negli anni 90 è stata identificata una nuova famiglia di metaboliti dell'acido arachidonico, denominati iso-eicosanoidi, che hanno origine attraverso un meccanismo non enzimatico di perossidazione lipidica catalizzato da radicali dell'ossigeno (Figura 44.1). Sono stati caratterizzati composti analoghi alle prostaglandine ($PGF_{2\alpha}$, PGD_2 e PGE_2), denominati isoprostani e analoghi del trombossano chiamati iso-trombossani. È stata riportata anche la formazione di analoghi dei leucotrieni e

degli acidi idrossieicosatetraenoici (HETE) denominati iso-leucotrieni e iso-HETE, rispettivamente. Uno degli isoprostani della serie F, la 8-iso- $PGF_{2\alpha}$, è dotata di importanti attività biologiche: 1) è vasocostrittrice a livello renale e coronarico; 2) è mitogenica nei confronti della muscolatura liscia vasale; 3) in presenza di bassissime concentrazioni di agonisti piastrinici (quali, ADP, collagene, trombina e acido arachidonico), induce una aggregazione completa delle piastrine. La vasocostrizione e l'aggregazione piastrinica indotte da 8-iso- $PGF_{2\alpha}$ possono essere antagonizzate competitivamente da antagonisti del recettore PGH_2/TXA_2 .

La 8-iso- $PGF_{2\alpha}$ si forma in vivo nell'uomo e viene eliminata in quantità facilmente misurabili nelle urine.

L'interesse per questa nuova famiglia di eicosanoidi, la cui formazione non viene modificata sostanzialmente dagli inibitori della PGH -sintasi mentre è inibita da composti antiossidanti, deriva dalle seguenti considerazioni:

- la misurazione dell'escrezione urinaria di composti come la 8-iso- $PGF_{2\alpha}$ rappresenta un indice non invasivo di perossidazione lipidica in vivo e può fornire un utile end-point biochimico per valutare l'effetto di farmaci antiossidanti nell'uomo;
- un'aumentata formazione di isoprostani in associazione con alcuni fattori di rischio cardiovascolare (fumo di sigaretta, ipercolesterolemia, diabete mellito, obesità) potrebbe rappresentare un importante meccanismo di trasduzione dello stress ossidativo in fenomeni di attivazione cellulare, quali l'attivazione piastrinica e la proliferazione delle cellule muscolari lisce dei vasi;
- alcuni effetti farmacologici degli antiossidanti potrebbero essere spiegati attraverso una ridotta formazione di iso-eicosanoidi biologicamente attivi (Tabella 44.5).

Recettori per gli eicosanoidi

Tutti i recettori per gli eicosanoidi finora caratterizzati e clonati sono recettori accoppiati a proteine G. Benché

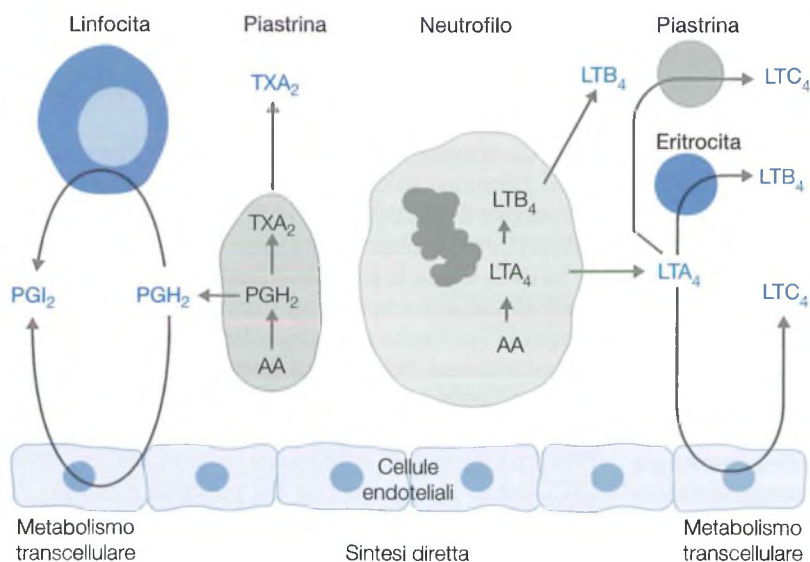


FIGURA 44.7 Interazioni tra cellule del sangue e della parete vasale nella formazione di prostanoidei e leucotrieni. Le piastrine e i neutrofili (cellule generatrici) una volta attivate possiedono i sistemi enzimatici necessari per sintetizzare TXA_2 e LTB_4 . Allo stesso tempo, PGH_2 e LTA_4 sono liberati nell'ambiente extracellulare. Qui possono essere utilizzati da altre cellule (cellule accettrici) che non necessitano di essere attivate ma che possiedono enzimi quali la PGH -sintasi (cellule endoteliali e linfociti), la LTA_4 -idrolasi (globuli rossi) e la LTC_4 -sintasi (piastrine e cellule endoteliali) che portano alla formazione di PGI_2 , LTB_4 e LTC_4 . In questo modo i linfociti, che possiedono una scarsa attività PGH sintasica, possono produrre PGI_2 mentre i globuli rossi, le piastrine e le cellule endoteliali, che non possiedono 5-lipossigenasi, possono produrre LTB_4 e LTC_4 .

TABELLA 44.5 Aree di intervento farmacologico riconducibili a modificazioni mediate da eicosanoidi

Farmaci	Meccanismo(i)	Effetti
Glucocorticoidi	Induzione di proteine anti-PLA ₂ Inibizione dell'espressione di PGHS-2	Effetto antinfiammatorio
FANS	Inibizione PGHS-1 e PGHS-2	Effetto analgesico, antipiretico, antinfiammatorio; gastrolesività, nefrotossicità, tossicità cardiovascolare
ASA a basse dosi	Inibizione PGHS-1 piastrinica	Effetto antitrombotico; emorragie
Coxib	Inibizione PGHS-2	Effetto analgesico, antipiretico, antinfiammatorio; nefrotossicità e tossicità cardiovascolare
Antagonisti PGH ₂ /TXA ₂	Antagonismo dei recettori piastrinici e vasali TP	Effetto antitrombotico Riduzione gastrolesività da FANS
Antagonisti LTC ₄ /D ₄	Antagonismo dei recettori bronchiali	Effetto antiasmatico
Acidi grassi n-3	Competizione con acido arachidonico	Effetti molteplici, potenzialmente rilevanti in aterosclerosi e infiammazione
Vitamina E	Ridotta formazione di isoicosanoidi	Effetti molteplici, potenzialmente rilevanti in aterosclerosi e infiammazione

PLA₂: fosfolipasi A₂; PGHS-2: PGH sintasi-2; PGHS-1: PGH sintasi-1; FANS: farmaci antinfiammatori non steroidei; PG: prostaglandina; TX: trombassano; LT: leucotriene; ASA: acido acetilsalicilico.

dotati di una comune organizzazione molecolare a sette domini transmembrana, essi possono differire tra loro per la specificità farmacologica, meccanismo di trasduzione del segnale e distribuzione tissutale.

Recettori dei prostanoidi

I recettori dei prostanoidi possono essere classificati in 5 tipi sulla base dell'affinità ai cinque prostanoidi naturali: PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ e TXA₂ (Tabella 44.6). Questi recettori sono denominati P-recettori e vengono preceduti da una lettera indicante il prostanoido naturale per il quale il recettore ha maggiore affinità. La sigla dei recettori dei cinque prostanoidi elencati è quindi DP, EP, FP, IP, e TP, rispettivamente. Inoltre, i recettori EP sono stati suddivisi in 4 sottotipi (EP₁, EP₂, EP₃ ed EP₄) sulla base della loro affinità a una serie di agonisti e antagonisti. Tutti questi recettori sono stati clonati e i relativi meccanismi di trasduzione del segnale sono stati caratterizzati (Tabella 44.6).

I recettori per la PGD₂

Studi farmacologici hanno evidenziato la presenza di recettori per la PGD₂ nella muscolatura liscia vasale, nelle piastrine e nel cervello, dove sembrano essere coinvolti nella regolazione del sonno. L'attivazione del recettore causa l'inibizione dell'aggregazione piastrinica e inibisce il tono della muscolatura liscia vasale. Al contrario, la PGD₂ contrae la muscolatura liscia tracheale e bronchiale. Due recettori per la PGD₂ sono stati identificati: il DP e il CRTH2. Mentre il DP fa parte della famiglia dei recettori dei prostanoidi, il CRTH2 è strettamente correlato ai recettori chemiotattici, quali il N-formilmetionil-leucilfenilalanina (fMLP). Essi sono accoppiati alla adenilato ciclasi attraverso l'interazione con due diverse proteine G, G_i e G_s, rispettivamente. Entrambi i recettori sembrano essere coinvolti nelle risposte allergiche. Alcuni metaboliti non enzimatici della PGD₂, quali la PGJ₂ (9-deossi-Δ⁹-PGD₂) e la 15-deossi-Δ^{12,14}-PGJ₂ (15d-PGJ₂) sono in grado di interagire e di attivare un recettore nucleare il *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ* (PPAR-γ) che fa parte della famiglia dei fattori di trascrizione. L'attivazione di questo recettore nucleare nei monociti/macrofagi si associa all'inibizione dell'espressione di

TABELLA 44.6 Classificazione dei recettori dei prostanoidi

Tipo	Sottotipo	Agonista	Antagonista	Meccanismo di trasduzione del segnale
DP		BW245C, ZK110841, RS93520, SQ27986	BWA868C, AH6809	↑ cAMP
EP	EP ₁	17-Ph-ω-PGE ₂ , ilprost ^a , sulprostone ^b	SC19220, AH6809, ZD-6416	↑ IP ₃ /DAG/Ca ²⁺
	EP ₂	Butaprost, AH13205, misoprostolo, AY23626 ^c	AH6809 ^d	↑ cAMP
	EP ₃	Enprostil, GR63799, sulprostone, misoprostolo, AY23626	DG-041	↓ cAMP ↑ IP ₃ /DAG/Ca ²⁺
	EP ₄	ND	AH22921, AH23848 ^e	↑ cAMP
FP		Fluprostenolo, cloprostenolo, latanoprost	ND	↑ IP ₃ /DAG/Ca ²⁺
IP		Cicaprost, octimibate, ilprost	ND	↑ cAMP
TP		U46619, U44069, STA ₂ , IBOP, AGN192093	GR32191, sulotroban, ifetroban, daltroban, terutroban	↑ IP ₃ /DAG/Ca ²⁺

cAMP: AMP ciclico; DAG: diacilglicerolo; IP₃: inositotrifosfato; ND: non disponibile

^a ilprost è un agonista parziale per il recettore EP₁, mentre è un agonista pieno per il recettore IP; ^b sulprostone è agonista più potente per il recettore EP₃; ^c misoprostolo e AY23626 sono entrambi anche agonisti del recettore EP₃; ^d AH6809 è anche antagonista dei recettori EP₁ e DP; ^e AH22921 e AH23848 sono anche antagonisti del recettore TP.

geni pro-infiammatori e quindi si è ipotizzato un ruolo della 15d-PGJ₂ nel processo di risoluzione della risposta infiammatoria. Questa ipotesi è stata verificata in un modello di pleurite indotta da carragenina, nel ratto, dove le cellule predominanti dopo 2 ore sono i PMN mentre le cellule mononucleate sono dominanti dalle 24 ore fino a 48 ore quando si realizza la risoluzione dell'infiammazione. Gilroy e collaboratori hanno evidenziato che in questo modello di infiammazione, l'espressione della COX-2 aumenta a 2 ore, per poi ridursi gradualmente e aumentare di nuovo a 48 ore, in associazione alla risoluzione dell'infiammazione. Gli Autori hanno mostrato che la massima biosintesi di PGE₂ si generava in modo COX-2 dipendente a 2 ore, mentre a 48 ore era la 15d-PGJ₂ a dominare, sempre attraverso l'attività della COX-2. Questi risultati supportano il duplice ruolo della COX-2 sia nell'infiammazione che nella sua risoluzione attraverso la sintesi di prostanoidi diversi. Tuttavia, gli studi di Fitzgerald, utilizzando tecniche analitiche più specifiche (quale la gas cromatografia/spettrometria di massa) per 15d-PGJ₂ di quelle immunoenzimatiche utilizzate da Gilroy, hanno portato a mettere in discussione il suo ruolo in vivo. Infatti, la 15d-PGJ₂ risulta essere un prodotto minore di COX-2 in vivo e i livelli prodotti endogenamente difficilmente possono attivare PPAR_γ e/o modulare l'azione di NF-κB, perché questi effetti si realizzano a concentrazioni molto alte di 15d-PGJ₂ (nell'ordine del μM) che difficilmente possono prodursi in vivo.

■ I recettori EP per la PGE₂

Siti di legame per la PGE₂ sono stati identificati in diverse sedi, quali gli adipociti, l'utero, il rene, la mucosa gastrica, le piastrine e i macrofagi. Quattro sottotipi recettoriali per la PGE₂ sono stati clonati. Nella tabella 44.6 sono riportati i meccanismi di traduzione del segnale attivati dall'agonista naturale (la PGE₂) e da diversi agonisti sintetici. Il sottotipo recettoriale EP₁ e quello EP₂ sono ampiamente distribuiti sulle cellule della muscolatura liscia dove mediano la risposta di contrazione e di rilassamento, rispettivamente. Il sottotipo EP₃ è ampiamente distribuito in diversi tipi cellulari; attraverso inibizione dell'adenilato-ciclastasi, esso causa inibizione della liberazione dei neurotrasmettitori del sistema nervoso autonomo, inibizione della secrezione gastrica e inibizione della lipolisi negli adipociti. Questo sottotipo recettoriale può operare anche sul turnover del fosfatidilinositolo con aumento del Ca²⁺ libero intracellulare e indurre l'influsso di Ca²⁺ extracellulare, così provocando la contrazione della muscolatura liscia e il cambiamento di forma delle piastrine. Numerose isoforme del sottotipo recettoriale EP₃ sono state identificate come prodotte per *splicing* alternativo a livello della regione C-terminale e sono accoppiate a differenti proteine G. A livello renale, nelle cellule del tubulo collettore e nel tratto ascendente dell'ansa di Henle, la PGE₂ svolge un ruolo nel controllo del riassorbimento dell'acqua e del sodio attraverso la sua interazione con i due sottotipi recettoriali EP₁ ed EP₃. Il sottotipo recettoriale EP₄, attraverso l'aumento dei livelli di cAMP, regola l'omeostasi intestinale, le risposte

infiammatorie e la formazione ossea indotta da PGE₂. Sono stati sviluppati numerosi antagonisti del recettore EP₁; in particolare, il composto ZD-6416 è stato testato in modelli di infiammazione e di analgesia e ne è stata evidenziata l'efficacia clinica. Infatti, in volontari sani, questo composto riduceva il dolore esofageo causato dalla stimolazione elettrica.

Tra i numerosi antagonisti del sottotipo recettoriale EP₃, il composto DG-041 è in fase I di sperimentazione in soggetti sani, e rappresenta un farmaco promettente per il trattamento di malattie vascolari periferiche.

Per quanto concerne il sottotipo recettoriale EP₄, l'utilizzo di antagonisti di questo recettore in studi in vitro e in modelli animali ha permesso di evidenziare che questo recettore è coinvolto nella tumorigenesi del colon, favorita da una eccessiva produzione di PGE₂.

■ Il recettore FP per la PGF_{2α}

I recettori per la PGF_{2α} sono presenti a livello uterino, vascolare e bronchiale. Essi stimolano l'attività della fosfolipasi C e quindi inducono aumento della [Ca²⁺]_i; la PGF_{2α} è perciò capace di indurre contrazione della muscolatura liscia nei distretti citati sopra. L'attivazione dei recettori FP presenti nel corpo luteo è responsabile della luteolisi. Inoltre, la stimolazione di questi recettori abbassa la pressione intraoculare. È stata documentata la presenza di una specie variante di questo recettore ottenuto per *splicing* alternativo a livello della regione C-terminale.

■ Il recettore IP per la PGI₂

La PGI₂, il prodotto più abbondante del metabolismo dell'acido arachidonico nel tessuto vascolare, inibisce l'aggregazione piastrinica e induce vasodilatazione attraverso la sua interazione con recettori che, mediante una proteina G_s, attivano l'adenilato-ciclastasi.

I recettori IP sono ampiamente distribuiti nella muscolatura liscia delle arterie e nelle piastrine. Recentemente, sono stati identificati recettori IP a livello del sistema nervoso centrale.

Esistono diversi potenti agonisti per i recettori IP (cicaprost, octimibate, ilprost), ma molti di questi riconoscono anche altri recettori dei prostanoidi, in particolare i recettori EP. Al contrario, non sono disponibili antagonisti per questi recettori.

■ I recettori TP per il TXA₂

A causa della instabilità chimica del TXA₂ e del suo precursore PGH₂ (emivite misurate in vitro: 30 secondi e 5 minuti, rispettivamente), le azioni biologiche di queste sostanze sono state studiate utilizzando degli analoghi chimicamente stabili (ad esempio, U46619, IBOP; Tabella 44.6). Siti di legame per questi composti sono stati identificati sulle piastrine, sulle cellule della muscolatura liscia vascolare e bronchiale e sulle cellule mesangiali del glomerulo renale.

Nelle piastrine, il TXA₂ e la PGH₂ agiscono su un recettore comune con affinità simile. L'attivazione di questo recettore causa l'aumento della [Ca²⁺]_i, sia per l'apertura di canali di membrana che per l'attivazione della fosfolipasi

C. Il recettore piastrinico attiva la fosfolipasi C attraverso una proteina G insensibile alla tossina della pertosse. Studi farmacologici e biochimici hanno evidenziato la presenza di almeno due isoforme del recettore piastrinico TP. Una forma a bassa affinità per l'agonista IBOP media la secrezione dei granuli e l'aggregazione piastrinica mentre la forma ad alta affinità per l'agonista media il cambiamento di forma delle piastrine. I meccanismi di trasduzione del segnale associati all'attivazione del recettore TP del tessuto vascolare non sono stati studiati in modo esteso. Comunque, sembra che l'aumento dei livelli di calcio libero nel citoplasma svolga un ruolo importante nella contrazione vasale e mesangiale indotte dal TXA₂. Sebbene studi farmacologici suggeriscano una eterogeneità recettoriale, un solo gene codificante per il recettore TP è stato clonato da una libreria di placenta. Una isoforma variante del recettore ottenuta per *splicing* alternativo della coda carbossiterminale del recettore è stata clonata da una libreria di cellule endoteliali ombelicali umane. Le due isoforme del recettore sono denominate TP α e TP β . Solo il TP α è stato identificato nelle piastrine, mentre entrambe le isoforme sono presenti sia nelle cellule endoteliali che in quelle della muscolatura liscia vascolare. L'attivazione del recettore causa anche la sua desensibilizzazione, sia per disaccoppiamento dalla proteina G che per la diminuzione del numero dei recettori.

L'attivazione dei recettori TP può essere bloccata da specifici antagonisti recettoriali (sulotroban, ifetroban, daltroban, GR 32191, terutroban). È degna di menzione la dimostrazione che un antagonista del recettore TP riduce la gastrolesività indotta da FANS. Poiché in queste condizioni sperimentali la sintesi di PGH₂ e TXA₂ viene impedita dal blocco dell'attività ciclossigenasica, è verosimile che l'effetto farmacologico dell'antagonista sia indipendente dalla formazione di prostanoidei e riconducibile, forse, all'antagonismo recettoriale di isoprostani tipo 8-iso-PGF_{2 α} . Inoltre, la capacità di questi farmaci di antagonizzare gli effetti del TXA₂ prodotto da cellule che esprimono COX-2 (ad esempio, monociti/macrofagi) suggerisce che lo spettro di attività farmacologiche degli antagonisti del recettore TP possa essere diverso da quello dell'aspirina.

Nonostante queste premesse fisiopatologiche e farmacologiche, il terutroban (l'unico antagonista del recettore TP che abbia completato la fase 3 di sviluppo clinico) non si è dimostrato più efficace dell'aspirina nel prevenire le complicanze vascolari maggiori.

Recettori dei leucotrieni

Sono state caratterizzate due diverse classi di recettori per i leucotrieni: a) recettori per i leucotrieni sulfidopeptidici, LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (CysLT); b) recettori per l'LTB₄ (BLT).

■ I recettori per i leucotrieni sulfidopeptidici

L'LTCC₄ induce contrazione della muscolatura liscia vasale e bronchiale. Inoltre, esso causa aumento della permeabilità vasale, soprattutto a livello venulare. In vivo, l'LTCC₄ viene convertito da una γ -glutamyl transpeptidasi

in LTD₄, a sua volta trasformato in LTE₄ a opera di una dipeptidasi. L'LTCC₄ e l'LTE₄ condividono molte delle attività biologiche dell'LTCC₄. I leucotrieni sulfidopeptidici esercitano numerosi effetti pro-infiammatori e sono importanti mediatori dell'asma, della rinite allergica e di altre condizioni infiammatorie croniche.

Due recettori dei leucotrieni sulfidopeptidici sono stati caratterizzati e denominati CysLT₁ e CysLT₂. Il primo, precedentemente indicato come il recettore per il LTD₄, è bloccato da una serie di antagonisti con differente struttura, chiamati "antagonisti classici", e anche dal composto BAYu9773. Diversamente, il CysLT₂ che precedentemente era stato indicato come il recettore del LTC₄, non è bloccato dagli "antagonisti classici" mentre lo è da BAYu9773.

L'attivazione del recettore CysLT₁ induce l'aumento dei livelli di calcio libero intracellulare e la stimolazione del turnover del fosfatidil-inositolo. Sembra che questo recettore possa essere associato a più di una proteina G, e solo una di queste sembra essere sensibile alla tossina della pertosse. Il recettore CysLT₁ subisce una desensibilizzazione omologa.

Diversi antagonisti del recettore CysLT₁ sono stati sviluppati come farmaci antiasmatici e sono utilizzati per il trattamento dell'asma e della rinite allergica. Tra questi il zafirlukast, montelukast e il pranlukast sono oggi commercialmente disponibili in molti Paesi. Per la loro azione antiflogistica, i farmaci anti-leucotrieni (inibitori della 5-lipossigenasi e antagonisti recettoriali del CysLT₁) sono appropriati come terapia di mantenimento nei pazienti con asma in cui non sia sufficiente l'uso dei soli broncodilatatori. Inoltre, questi farmaci potrebbero essere somministrati in pazienti con asma di tipo severo allo scopo di ridurre la dose giornaliera di glucocorticoidi. Alla luce di una certa variabilità nella risposta a questi agenti, è stata suggerita l'esistenza una forma di asma dipendente dalla biosintesi di leucotrieni. Così, i leucotrieni sulfidopeptidici sembrano svolgere un ruolo preminente nell'asma indotta da aspirina e dall'esercizio fisico, dove i farmaci anti-leucotrieni possono rappresentare il trattamento di prima scelta.

Recentemente è stato clonato il CysLT₂ e il suo mRNA è stato identificato nei macrofagi polmonari, nelle cellule della muscolatura liscia bronchiale, nelle cellule cardiache del Purkinje, nell'endotelio vascolare, nelle cellule della midollare del surrene, nei leucociti del sangue periferico e nel cervello. La sua alta espressione nel tessuto cardiaco e vascolare ha suggerito un suo ruolo fisiopatologico in questi tessuti.

■ I recettori per LTB₄

L'LTB₄, prodotto principalmente dai PMN, induce la chemiotassi, l'adesione, l'aggregazione e la liberazione di granuli lisosomiali e di anione superossido. Due recettori per l'LTB₄ sono stati identificati. Il BLT₁ è espresso principalmente nei leucociti e la sua attivazione media una risposta chemiotattica. Il BLT₂ è invece espresso in modo ubiquitario ma lega l'LTB₄ con minore affinità rispetto al BLT₁.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Gli eicosanoidi sono una famiglia di composti biologicamente attivi generati dall'acido arachidonico attraverso diverse vie metaboliche, sia enzimatiche che non enzimatiche.
- ▶ Gli eicosanoidi non sono ormoni, ma autacoidi che agiscono nelle immediate vicinanze del luogo di produzione attraverso l'interazione con specifici recettori, principalmente della famiglia dei GPCR.
- ▶ Per due sottofamiglie di eicosanoidi, i prostanoidi e i leucotrieni, sono stati sviluppati farmaci che agiscono inibendo la sintesi o interferendo con l'azione dell'eicosanoide a livello recettoriale.
- ▶ I FANS inibiscono l'attività delle ciclo ossigenasi (COX) e svolgono azioni analgesiche, antipiretiche e antinfiammatorie, ma possono causare alcuni effetti collaterali a carico del sistema gastrointestinale e cardiovascolare.
- ▶ L'aspirina, un FANS che modifica COX-1 e COX-2 irreversibilmente, è utilizzata a basse dosi nella terapia antitrombotica per la sua azione preferenziale di inattivazione della COX-1 piastrinica.
- ▶ Gli antagonisti del recettore CysLT1 attivato dall'LTD₄ sono utilizzati nella terapia dell'asma.
- ▶ Gli iso-eicosanoidi, che si formano attraverso un processo di perossidazione lipidica non enzimatica catalizzata dai radicali dell'ossigeno, comprendono una serie di isomeri delle principali classi di eicosanoidi.
- ▶ Tra questi, gli isoprostani della serie F, isomeri della prostaglandina F_{2α}, sono utilizzati come marker di stress ossidativo nell'uomo.

Bibliografia essenziale

- ▶ Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA et al. Biosynthesis of 15-deoxy-Δ¹², 14-PGJ₂ and the ligation of PPARY. *J Clin Invest* 2003;112: 945-55.
- ▶ Boutaud O, Oates JA. Study of inhibitors of the PGH synthases for which potency is regulated by the redox state of the enzymes. *Methods Mol Biol* 2010;644:67-90.
- ▶ Evans JF. Cysteinyl leukotriene receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:587-97.
- ▶ FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001;345:433-42.
- ▶ Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001;294:1871-5.
- ▶ Jones RJ, Giembycz MA, Woodward DF. Prostanoid receptor antagonists: development strategies and therapeutic applications. *Br J Pharmacol* 2009;158:104-45.
- ▶ Maclouf J, Folco G, Patrono C. Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost* 1998;79:691-705.
- ▶ Mayer RJ, Marshall LA. New insights on mammalian phospholipase A₂(s); comparison of arachidonolyselective and -nonselective enzymes. *Faseb J* 1993;7:339-48.
- ▶ Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 2001;108:25-30.
- ▶ Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005;353:2373-83.
- ▶ Patrono C, Baigent C, Hirsh J et al. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. 8th ed. *Chest* 2008;133:199S-233S.
- ▶ Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2309-15.
- ▶ Picot D, Loll PJ, Garavito MR. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature* 1994;367:243-9.
- ▶ Samson A, Holgate S. Leukotriene modifiers in the treatment of asthma. *BMJ* 1998;316:1257-8.
- ▶ Smith WL, Garavito RM, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271: 33157-60.

SEZIONE

11

Modulazione farmacologica dei processi di difesa

CAPITOLO 45

Modulazione farmacologica del sistema immune

Carlo Riccardi, Graziella Migliorati

CAPITOLO 46

Meccanismi d'azione dei farmaci antinfettivi

Francesco Scaglione

CAPITOLO 47

Strategie farmacologiche nell'infiammazione

Salvatore Cuzzocrea, Maria Antonietta Catania

11

Modulazione farmacologica del sistema immune

CAPITOLO

45

Carlo Riccardi, Graziella Migliorati

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire la conoscenza dei più importanti farmaci ad azione immunomodulante utilizzati nel trattamento di patologie infiammatorie/autoimmunitarie e nei trapianti d'organo
- ▶ Acquisire la conoscenza dei meccanismi d'azione molecolare, delle principali indicazioni terapeutiche e delle reazioni avverse di maggiore rilevanza clinica

L'immunofarmacologia è la scienza che studia gli agenti farmacologici in grado di modificare la risposta immunitaria. Al fine di ottenere risultati terapeutici è talvolta necessario, come nel caso dei trapianti, deprimere la risposta immunitaria utilizzando farmaci detti *immunosoppressori*. In altri casi è invece necessario stimolare la risposta immunitaria, ad esempio in stati di immunodepressione acquisita come nell'AIDS, con farmaci detti *immunostimolanti*. Alcuni Autori usano il termine *Biological Response Modifiers* (BRMs, modificatori della risposta biologica); con questo termine si definiscono tutti quegli agenti (comprendenti farmaci, batteri e prodotti biologici) in grado sia di inibire che di aumentare la risposta immunitaria e cioè immunosoppressori e immunostimolanti.

La risposta immunitaria

Il sistema immunitario rappresenta un sistema complesso, altamente autoregolato, con cui l'organismo riconosce i propri costituenti come "self", a cui è tollerante, e protegge se stesso dal "non-self", come ad esempio patogeni, cellule estranee (nel caso dei trapianti) o trasformate (cellule neoplastiche), contribuendo in modo determinante alla sopravvivenza, al controllo omeostatico dello sviluppo e al mantenimento dell'integrità di tessuti e organi. La protezione dalle infezioni e dalle malattie è fornita dalle due principali componenti del sistema immunitario: l'immunità innata o naturale, e l'immunità acquisita o adattativa.

L'immunità naturale è la prima linea di difesa contro antigeni estranei, e i suoi effettori principali sono il sistema del complemento, il lisozima e diverse componenti cellulari, quali macrofagi, granulociti, mast cellule e cellule natural killer (NK).

L'immunità acquisita, è caratterizzata da un elevato grado di specificità e dalla capacità di acquisire una forte "memoria"; gli effettori più importanti sono i linfociti B, che producono anticorpi (effettori dell'immunità umorale), e i linfociti T con le loro diverse funzioni (citotossica, helper o suppressor), che sono i mediatori dell'immunità cellulo-mediata. Le immunoglobuline espresse sulla membrana dei linfociti B costituiscono i recettori per antigeni solubili (di natura proteica, polisaccaridica o lipidica) di cui riconoscono epitopi esposti sulla superficie delle molecole. Il riconoscimento di un antigene da parte dei linfociti richiede, invece, la partecipazione delle cellule che presentano l'antigene (*Antigen Presenting Cells*, APCs), tra cui macrofagi, cellule dendritiche e gli stessi linfociti B. Le APCs svolgono un ruolo importante nella risposta immunitaria. Esse infatti presentano l'antigene, in associazione con le proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) di classe I e II (Figura 45.1). Esistono molte sottopolazioni di linfociti T che si differenziano in base alla composizione del recettore per l'antigene (TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$), la specificità per l'antigene e il ruolo effettore. I linfociti T con recettore $\alpha\beta$ reagiscono con l'antigene presentato dal MHC di classe I o II mentre i $\gamma\delta$ sono generalmente indipendenti dall'MHC e sono coinvolti nella risposta a stress tissutali dipendenti o meno da infezioni. L'attivazione dei linfociti T helper CD4⁺ dipende dall'interazione fra TCR e complesso peptide-MHC di classe II sulle APCs. L'attivazione dei linfociti T citotossici CD8⁺ richiede il riconoscimento da parte del TCR del complesso peptide-MHC di classe I sulle APCs. Sia le cellule T CD4⁺ che le CD8⁺ necessitano di segnali costimolatori mediati da molecole espresse sulle APCs. Nelle complesse interazioni fra le cellule del sistema immunitario un ruolo fondamentale è svolto

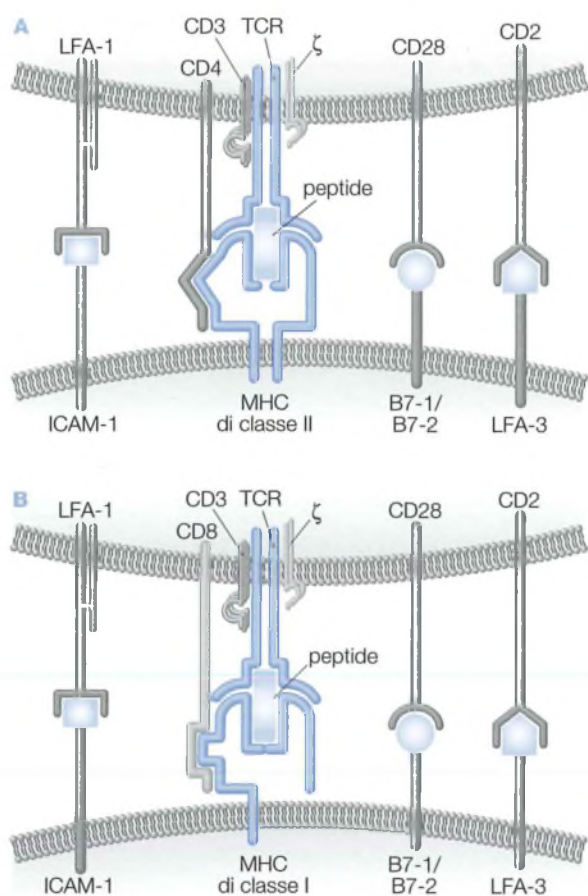


FIGURA 45.1 L'antigene è presentato dalle APC ai linfociti in forma di peptide in associazione con il MHC e stimola i linfociti T specifici tramite il recettore per l'antigene (TCR). Altre molecole di superficie e i relativi ligandi sono coinvolti nell'attivazione di linfociti T helper CD4⁺ (A) e di linfociti T citotossici CD8⁺ (B). I MHC sono distinti in due classi che differiscono per struttura e funzione. La molecola MHC di classe I è costituita da una sola proteina che contiene il sito di legame per il peptide antigenico che essa dovrà presentare ai linfociti T CD8⁺. MHC di classe II è invece formato da due catene proteiche strettamente associate fra loro a formare il sito di legame del peptide che viene presentato ai linfociti CD4⁺. Gli antigeni presentati da MHC di classe I sono prevalentemente di origine intracellulare, mentre quelli presentati da MHC di classe II sono prevalentemente extracellulari (ad esempio, antigeni batterici). Le molecole linfocitarie LFA-1, CD2 e CD28 e i loro ligandi presenti sulle cellule che presentano l'antigene (ICAM-1, LFA-3 e B7) coadiuvano a stabilire e mantenere il contatto tra le due cellule e/o promuovono la trasduzione del segnale.

dalle citochine, mediatori solubili di natura proteica che svolgono sia funzioni regolatorie che funzioni effettrici dirette. I mediatori dell'immunità acquisita svolgono un ruolo fondamentale non solo nelle normali risposte immunitarie a patogeni o cellule tumorali, ma anche nei fenomeni autoimmunitari e nel rigetto dei trapianti.

Il concetto di autoimmunità

Si parla di autoimmunità quando il sistema immune, a causa della alterazione della capacità di discriminare tra

self e non-self, attacca tessuti normali e sani dello stesso individuo. Infatti, malgrado la complessità dei meccanismi che presiedono al controllo dello sviluppo e del mantenimento della tolleranza per il self, sono presenti nell'organismo molti linfociti, sia T che B, potenzialmente autoreattivi. La stimolazione dei linfociti autoreattivi può dipendere da diversi fattori e in particolare anche da alterata concentrazione e/o sequenza del peptide (dovuto ad alterazione dei meccanismi di processazione) presentato da cellule accessorie. Infatti, mentre un determinato peptide (potenzialmente immunogenico) presentato in adeguate concentrazioni può garantire il mantenimento dello stato di tolleranza, la variazione della concentrazione e/o della natura del peptide può dar luogo alla stimolazione della reattività immunitaria. Tra le principali malattie autoimmuni sono comprese la miastenia grave, la sclerosi multipla, l'artrite reumatoide, il diabete mellito di tipo I e il lupus eritematoso; in tutti queste situazioni patologiche l'alterazione del riconoscimento (e quindi dello stato di tolleranza) causa l'instaurarsi della reattività immunitaria contro epitopi condivisi da tessuti normali del proprio organismo. Naturalmente l'instaurarsi o no della malattia dipende non solo dalle caratteristiche delle strutture antigeniche sopra menzionate ma anche dal rilascio di antigeni generalmente sequestrati in strutture cellulari inaccessibili ai linfociti, dalla capacità di presentazione (ad esempio dalla alterata espressione dell'MHC) e riconoscimento dell'antigene, dalla produzione di citochine e dal variare di altri segnali regolatori (di attivazione o anche soppressivi) che presiedono allo sviluppo della risposta immunitaria.

Sebbene recentemente si stia dando grande rilevanza ad approcci terapeutici specifici, consistenti ad esempio nel tentativo di indurre tolleranza verso specifici peptidi, pur tuttavia ancora oggi l'approccio terapeutico più efficace e più utilizzato nella pratica clinica si basa sull'uso di farmaci immunosoppressori. Va infine ricordato che accanto alle patologie sopra riportate, che sono considerate vere e proprie malattie autoimmunitarie, l'uso di farmaci immunosoppressori è spesso utile anche per malattie definite infiammatorie (ad esempio, la rettocolite ulcerativa, il morbo di Crohn ecc.) dove la componente autoimmunitaria gioca comunque un ruolo importante nel determinare l'insorgenza e il protrarsi della malattia.

Farmaci immunosoppressori

I farmaci immunosoppressori sono usati nei trapianti d'organo, per inibire la reazione di rigetto dell'ospite verso il trapianto o la reazione del trapianto verso l'ospite (GVHD) nel caso del trapianto incompatibile di midollo osseo, nelle malattie autoimmunitarie e, spesso, in malattie infiammatorie dotate di un'importante componente autoimmunitaria.

Chemioterapici antitumorali

Sono usati in terapia come farmaci immunosoppressori.

Ciclofosfamide

La ciclofosfamide è un antineoplastico appartenente al gruppo delle mostarde azotate contenente un gruppo ciclofosfamidico, che viene usato nella terapia di molte forme tumorali e che trova largo impiego, da solo o in associazione soprattutto con ciclosporina e corticosteroidi, nella terapia immunosoppressiva.

Meccanismo d'azione

L'azione della ciclofosfamide è direttamente correlata alla capacità di alchilare il DNA all'azoto 7 della guanina provocando alcune modificazioni della struttura del DNA e delle sue funzioni quali:

1. alterazione del codice genetico, in quanto la struttura della guanina alchilata favorisce la formazione di una coppia di basi anomale con la timina invece che con la citosina;
2. rottura dell'anello imidazolico della guanina;
3. depurinazione del DNA per uscita di un residuo di guanina e conseguente rottura delle eliche del DNA;
4. unione di una coppia di molecole di guanina con legame crociato delle eliche del DNA (cross-linking) che non può replicarsi.

L'attività immunosoppressoria della ciclofosfamide risiede nella capacità, al pari di altri agenti alchilanti non ciclo-specifici, di inibire la proliferazione cellulare e causare la morte di linfociti. Sebbene il farmaco sia in grado di legare anche il DNA delle cellule non proliferanti (in fase G₀), l'azione è più potente su cellule proliferanti in fase S su cui causa un blocco in G₂ (fase premitotica) a cui segue la morte cellulare (morte mitotica). L'effetto citocida associato all'attività antiproliferativa dà ragione inoltre del fatto che il trattamento in vivo con ciclofosfamide risulta essere più potente se associato alla stimolazione antigenica in grado di indurre la proliferazione dei linfociti specifici per l'antigene. In tal modo il trattamento causa la delezione del clone linfocitario stimolato dal trattamento antigenico e induce tolleranza. La ciclofosfamide è attiva sia su linfociti T che su linfociti B; è molto efficace nel sopprimere la risposta anticorpale e, quindi, particolarmente utile in quelle patologie, come il lupus eritematoso sistemico, in cui gli autoanticorpi svolgono un ruolo patogenetico.

Caratteristiche farmacocinetiche

È ben assorbita per via orale e richiede trasformazione metabolica attraverso enzimi microsomiali del sistema del citocromo P-450. La sua emivita plasmatica è di circa 7 ore.

Principali usi clinici

La ciclofosfamide, così come altri chemioterapici immunosoppressori, è stata parzialmente soppiantata in alcuni usi clinici dalla ciclosporina-A (CsA). La ciclofosfamide rappresenta comunque il trattamento elettivo nella poliarterite nodosa, nella terapia della maggior parte delle glomerulonefriti, nella vasculite di Wegener e in altre forme di vasculite sistemica anche in associazione con prednisone e nella fibrosi polmonare nel caso di mancata risposta alla terapia con glucocorticoidi. È inoltre usata

nel trattamento della dermatomiosite-polimiosite, nelle anemie emolitiche autoimmuni, nella sindrome nefrosica, nella porpora trombocitopenica quando manca risposta alla terapia steroidea e nel lupus eritematoso sistemico, soprattutto qualora si abbia interessamento renale o del sistema nervoso centrale. È occasionalmente attiva nel trattamento della miastenia grave. Infine la ciclofosfamide è usata nella maggior parte dei protocolli di condizionamento di pazienti da sottoporre a trapianto di midollo osseo.

Effetti avversi

Tra i principali effetti avversi della ciclofosfamide alcuni sono dovuti all'azione citocida contro tutti i tessuti proliferanti e quindi depressione midollare con leucopenia e trombocitopenia, aumento della suscettibilità alle infezioni, alopecia, danno germinale gonadico e sterilità. Può inoltre causare cistite emorragica, insorgenza di tumori maligni secondari, fibrosi polmonare interstiziale, nausea, vomito e anoressia.

Azatioprina

L'azatioprina è un antimetabolita purinico fase-specifico che, in associazione con prednisone, è stato usato per molti anni nel trattamento immunosoppressivo elettivo nei trapianti. La sua azione immunosoppressoria risiede essenzialmente nell'attività antiproliferativa nei confronti dei linfociti.

Meccanismo d'azione

La 6-mercaptopurina (acido tiouinico), formata dalla trasformazione metabolica della azatioprina, viene incorporata nelle molecole di RNA e DNA inibendone la sintesi. È anche inibita la sintesi proteica. L'azatioprina esplica un'azione soppressiva su linfociti sia T che B ed è soprattutto attiva su cellule proliferanti in fase S. All'inibizione della proliferazione segue la morte cellulare. L'azatioprina, come la ciclofosfamide, è potente nell'inibire la proliferazione di cellule immunocompetenti stimolate dall'antigene (risposta primaria), mentre è meno efficace su cellule della memoria (risposta secondaria). La maggiore resistenza delle cellule della memoria è dovuta alla loro bassa attività proliferativa e ai meccanismi di protezione dalla morte cellulare responsabili della loro capacità di sopravvivere a lungo.

Caratteristiche farmacocinetiche

L'azatioprina è ben assorbita dal tratto gastrointestinale e metabolizzata prevalentemente a 6-mercaptopurina, la quale a sua volta viene convertita nel principale metabolita inattivo, l'acido 6-tiourico, dalla xantina-ossidasi. Farmaci come l'allopurinolo, che inibiscono tale enzima, possono comportare aumento della tossicità dell'azatioprina. L'emivita plasmatica dell'azatioprina è di circa 10 minuti, quella della 6-mercaptopurina circa 1 ora.

Principali usi clinici

L'azatioprina è usata nella terapia immunosoppressoria in pazienti sottoposti a trapianto d'organo, talvolta in combinazione con ciclosporina e prednisone (ad

esempio, nel trapianto di cuore). È usata inoltre nel trattamento delle forme di artrite reumatoide resistenti ad altri farmaci, nell'anemia emolitica autoimmune e nella dermatomiosite-polimiosite in pazienti refrattari al trattamento con corticosteroidi. Può essere usata in associazione a corticosteroidi nella colite ulcerativa e nella malattia di Crohn, nel trattamento della GVHD (*Graft Versus Host Disease*) cronica.

Effetti avversi

L'uso dell'azatioprina è limitato dall'induzione di effetti avversi. In particolare, causa depressione midollare con leucopenia e trombocitopenia, tossicità gastrointestinale ed epatica, nausea e vomito. Può provocare aumento della suscettibilità alle infezioni e ha inoltre azione mutagena e cancerogena con aumento dell'incidenza di neoplasie secondarie in trattamenti a lungo termine. Questi ultimi effetti costituiscono il limite maggiore al suo uso.

Metotrexato

Meccanismo d'azione

Il metotrexato è un antineoplastico fase-specifico, inibitore della diidrofolato-reduttasi che porta all'inibizione della trasformazione dell'acido diidrofolico in acido tetraidrofolico. L'acido tetraidrofolico è a sua volta trasformato in N⁵, N¹⁰-metilentetraidrofolato, un cofattore essenziale per la sintesi di timidilato, purine, metionina e di glicina. La mancata formazione di acido tetraidrofolico causa inibizione della timidilato-sintetasi e quindi della trasformazione dell'acido deossiridilico in acido timidilico con conseguente interruzione della sintesi di DNA ed RNA. L'azione immunodepressiva del metotrexato è principalmente conseguenza della inibizione della proliferazione di linfociti T e B dovuta alla inibizione della sintesi di DNA. L'effetto sui linfociti T sembra comportare l'inibizione della produzione di citochine proinfiammatorie, quale il TNF α , e l'aumento della produzione di citochine antinfiammatorie.

Caratteristiche farmacocinetiche

Il metotrexato è rapidamente assorbito dal tratto gastrointestinale e ad alti dosaggi è di norma somministrato per via endovenosa. Nell'uomo il metabolismo del metotrexato è di solito molto ridotto, ma per dosaggi elevati si può avere accumulo di metaboliti di cui alcuni potenzialmente nefrotossici. L'eliminazione è prevalentemente renale.

Principali usi clinici

È usato come immunosoppressore in combinazione con la ciclosporina-A nella profilassi della GVHD in pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo. Il problema della GVHD è oggi meno frequente che in passato grazie alle procedure di rimozione di linfociti T dal midollo del donatore che vengono effettuate in molti trapianti. Inoltre il metotrexato è usato nel trattamento dell'artrite reumatoide anche in monoterapia a basse dosi, della polimialgia reumatica, del morbo di Crohn e della psoriasi. Può essere usato nel lupus eritematoso e nella dermatomiosite in alternativa ai glucocorticoidi.

Effetti avversi

I maggiori effetti avversi conseguenti alla terapia immunosoppressoria a basse dosi e a lungo termine sono diversi da quelli riscontrati con il trattamento antineoplastico (mucosite, nausea, vomito, diarrea, anafilassi, necrosi epatica e insufficienza renale) e sono: fibrosi epatica e polmonare, cirrosi e polmonite cronica asettica.

Farmaci immunosoppressori più specifici

Nel tentativo di ottenere agenti immunosoppressori più selettivi e meno tossici sono stati sperimentati alcuni composti, che, pur non potendo essere definiti immunosoppressori specifici, tuttavia presentano un profilo rischio/beneficio decisamente più favorevole rispetto agli agenti antitumorali sopra riportati.

Micofenolato mofetile

È il capostipite di una serie di composti, quali mizoribina, merimepodib (VX-497) e altri ancora in fase di sperimentazione, che agiscono inibendo l'enzima inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH), attualmente identificato come importante bersaglio per farmaci immunosoppressori maggiormente selettivi e con minori effetti collaterali rispetto a farmaci già in uso. Alcuni di questi farmaci esplicano attività antivirale quando associati a IFN α nell'epatite cronica C.

Meccanismo d'azione

Il micofenolato mofetile (MFM) è l'estere 2-morfolinoetico dell'acido micofenolico (AM), metabolita attivo, inibitore reversibile e non competitivo dell'IMPDH e della sintesi de novo delle purine. Il farmaco agisce in modo abbastanza selettivo sui linfociti T e B che dipendono da questa via metabolica per la biosintesi delle purine, avendo scarsa disponibilità della via alternativa della ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi (HGPRT), mentre altre cellule del midollo osseo fanno ricorso più facilmente alla HGPRT e vengono pertanto risparmiate dal trattamento con MFM. Con questo meccanismo l'MFM inibisce la proliferazione e diverse funzioni linfocitarie, quali la formazione di anticorpi e la migrazione leucocitaria. In particolare quest'ultimo effetto sembra dovuto all'inibizione della glicosilazione di proteine di superficie coinvolte nell'adesione alle cellule endoteliali. Si ipotizza, inoltre, che le proprietà farmacologiche dell'MFM siano conseguenza di meccanismi di azione aggiuntivi, come la capacità di indurre apoptosi nei linfociti T e l'inibizione della produzione di ossido nitrico (NO) da parte della ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS), quest'ultima come conseguenza della ridotta disponibilità di tetraidrobiopterina, cofattore di derivazione purinica che controlla l'attività dell'enzima. Livelli molto elevati di NO possono contribuire all'istaurarsi di fenomeni infiammatori, ad esempio nella fase acuta del rigetto di trapianto, quando l'organo trapiantato si presenta fortemente infiltrato di cellule infiammatorie che esprimono alti livelli di enzima. Alcuni ricercatori sostengono che l'MFM sia anche in grado di inibire la produzione delle principali citochine

di origine linfocitaria, ma non sono ancora disponibili dati conclusivi a questo proposito.

Caratteristiche farmacocinetiche

È ben assorbito per via orale e rapidamente idrolizzato ad AM (la cui emivita plasmatica è di circa 16 ore), che a sua volta viene metabolizzato a livello epatico a glucuronide-derivato farmacologicamente inattivo. Il metabolita glucuronide-derivato viene escreto nella bile e, a livello intestinale, per azione delle glucuronidasi batteriche, può liberare di nuovo AM con presenza di elevate concentrazioni di AM libero e formazione di un circolo enteroepatico, responsabile della tossicità intestinale del farmaco.

Principali usi clinici

L'MFM, in combinazione con CsA, prednisone o entrambi, è attualmente usato nel trapianto di rene; la sua estensione al trapianto di fegato, di cuore, di pancreas e di rene/pancreas è in corso di sperimentazione. Per quanto riguarda il trapianto di rene, è in fase di valutazione l'efficacia del farmaco usato in monoterapia o in associazione con solo steroide, o con steroide e CsA a basso dosaggio, schemi terapeutici che permetterebbero di evitare o ridurre la tossicità renale della CsA. È anche efficace nel trattamento dell'artrite reumatoide, della psoriasi, della miastenia grave e in altre patologie infiammatorie-autoimmunitarie.

Effetti avversi

Grazie all'effetto abbastanza selettivo sui linfociti, gli effetti avversi dell'MFM, soprattutto quelli a carico del midollo osseo, sono di più lieve entità confrontati con quelli di ciclofosfamide e azatioprina e raramente richiedono interruzione della terapia. I principali sono: disturbi gastrointestinali, trombocitopenia, leucopenia e infezioni. Allo scopo di diminuire la tossicità intestinale dell'MFM sono attualmente allo studio derivati dell'AM in grado di inibire l'enzima inosina monofosfato deidrogenasi, ma che non diano luogo a circolo entero-epatico; fra questi VX-497.

Mizoribina

La mizoribina è un analogo nucleosidico che, dopo conversione nella forma fosforilata, agisce con meccanismo simile al MFM inibendo la IMPDH. In alcuni Paesi il suo uso, in associazione con CsA, è approvato nel trapianto di rene in sostituzione dell'azatioprina, avendo una efficacia comparabile, ma una tossicità epatica e midollare molto inferiore. Recentemente il suo uso è stato esteso a patologie autoimmunitarie, quali lupus eritematoso e artrite reumatoide, spesso in associazione con corticosteroidi.

Brequinar

Il brequinar è un inibitore non competitivo della diidrorotato deidrogenasi (DHOD) umana, enzima coinvolto nella biosintesi delle pirimidine. Dal momento che i linfociti attivati necessitano della biosintesi de novo delle pirimidine per i processi di espansione clonale e di differenziazione terminale in cellule effettrici, il farmaco

inibisce la risposta proliferativa linfocitaria, ha un potente effetto immunosoppressivo ed esplica attività antibatterica e antimicotica. Usato originariamente come farmaco antitumorale, è attualmente in sperimentazione nei trapianti d'organo. Non sono ancora disponibili dati conclusivi per quanto riguarda farmacocinetica e tossicità.

Desossispergualina

La 15-desossispergualina (DSG), un analogo sintetico della spergualina, è un potente immunosoppressore in grado di inibire varie funzioni sia linfocitarie (produzione di anticorpi e generazione di linfociti T citotossici) che monocitarie (processazione e presentazione dell'antigene); dati recenti suggeriscono, inoltre, che sia in grado di agire anche sulle cellule dendritiche inibendone la maturazione. Il suo meccanismo d'azione non è del tutto noto, ma gli effetti sul sistema immunitario sembrano essere una conseguenza della capacità del farmaco di legare le proteine dello shock termico (*Heat Shock Proteins*, HSPs) e di inibire la produzione di citochine bloccando l'attività del fattore di trascrizione NFκB. Dati recenti suggeriscono, inoltre, che la DSG e un suo analogo, LF15-0195, siano in grado di facilitare l'attivazione caspatica indotta da stimoli apoptotici e con questo meccanismo potenzino la morte indotta da attivazione (*Activation Induced Cell Death*, AICD). Sia la DSG che LF15-0195 sono in sperimentazione nella prevenzione del rigetto di trapianto di rene, pancreas e cuore e nel trattamento delle vasculiti sistemiche.

Talidomide

La talidomide è un farmaco ansiolitico-ipnotico, somministrabile per via orale, attualmente non utilizzato a questo scopo a causa degli effetti teratogeni che si verificano se viene assunto durante la gravidanza (vedi **CD**: Approfondimento 2.4). Ciononostante, esso ha attività tumoricida e immunomodulante molto importante e un ampio spettro di usi clinici potenziali. Il suo meccanismo d'azione non è completamente conosciuto, ma è stato dimostrato che il farmaco sopprime la produzione di TNFα, stimola la produzione di IL-2 e IFNγ ed esplica effetti antiproliferativi, proapoptotici e antiangiogenici. Un analogo della talidomide, lenalidomide, sembra possedere maggiori proprietà immunomodulanti, ma minori effetti antiangiogenici. La talidomide è approvata per l'uso nel mieloma multiplo ed è in sperimentazione nella leucemia linfocitica cronica; la leflunomide nell'artrite reumatoide, nell'artrite psoriasica e, come trattamento di seconda linea nel mieloma multiplo. Gli effetti antiproliferativi della lenalidomide vengono potenziati dalla concomitante somministrazione di desametasone. Gli effetti avversi comprendono, oltre alla teratogenicità, neurotossicità, ipotiroidismo e aumentato rischio trombotico.

Inibitori della calcineurina

Gli antagonisti della calcineurina (Cn), ciclosporina (CsA) e FK-506 (tacrolimo) sono fra i farmaci immunosoppressori più potenti attualmente usati nella pratica clinica; la

loro introduzione in terapia ha segnato una svolta significativa nel campo dei trapianti portando sia un aumento della sopravvivenza di pazienti sottoposti a trapianto d'organo, sia una riduzione dell'incidenza di rigetto e delle complicazioni infettive, sia un miglioramento della qualità di vita. CsA e FK-506, insieme alla rapamicina, vengono anche identificati come immunosoppressori selettivi: infatti essi agiscono bloccando la trasduzione del segnale dei linfociti T, di cui inibiscono i processi di attivazione e proliferazione.

Ciclosporina-A e FK506

Da un punto di vista funzionale, la CsA rappresenta il capostipite di una serie di molecole tra loro chimicamente correlate (tra le più studiate: ciclosporina-A, -B, -C, -D, -E, -G, -H) e molecole chimicamente non correlate (i macrolidi FK506 e rapamicina) ma che agiscono in modo simile sui linfociti T. In particolare, CsA e FK506 agiscono con lo stesso meccanismo d'azione e sono molto simili per quanto riguarda le applicazioni terapeutiche e gli effetti avversi, anche se l'effetto immunosoppressivo di FK506 sembra essere 10-100 volte più potente di quello della CsA; la rapamicina esplica il suo effetto sui linfociti T con un meccanismo diverso.

Meccanismo d'azione

L'azione immunosoppressoria della CsA e di FK-506 è principalmente dovuta alla inibizione della proliferazione di linfociti T attraverso un blocco della via

Ca²⁺-dipendente della regolazione della trascrizione del gene della IL-2, che comporta, fra l'altro, il blocco della transizione G₀-G₁. Essi interagiscono con proteine citoplasmatiche, dette immunofiline. La CsA interagisce con le ciclofilline, tra cui la ciclofillina-A (CyPA), considerata il recettore più importante della CsA, che è una proteina intracellulare ubiquitaria di 165 aminoacidi (18 kDa) con attività peptidil-propil cis-trans isomerasica, attività che non sembra, però, essere coinvolta nel meccanismo d'azione della CsA. L'interazione farmaco-recettore porta alla formazione di un complesso macromolecolare formato da 2 pentameri sovrapposti di CyPA.

Il macrolide FK506 agisce in modo simile alla CsA legando le FK Binding protein (FKBP 12, 25, 56-59 kDa ecc.) tra cui un recettore citoplasmatico di 12 kDa (FKBP12) che, come CyPA, ha attività peptidil-prolil isomerasica. Il complesso CsA-CyPA, o FK506-FKBP12, è in grado di interagire con un'altra proteina citoplasmatica, la Cn, una serina/treonina fosfatasi, Ca²⁺-calmodulina-dipendente, essenziale per la trasduzione del segnale del TCR. L'interazione del complesso CsA-CyPA o FK506-FKBP12 con la Cn comporta l'inibizione dell'attività fosfatasi di quest'ultima e della defosforilazione di componenti della famiglia del fattore di trascrizione NF-AT (Nuclear Factor of Activated T lymphocytes). La defosforilazione di NF-AT è, a sua volta, un evento necessario per la traslocazione del fattore dal citoplasma al nucleo, dove, insieme ad altri regolatori trascrizionali, quali AP-1 ed NF-κB, attiva la trascrizione del gene della IL-2 e di altre molecole coin-

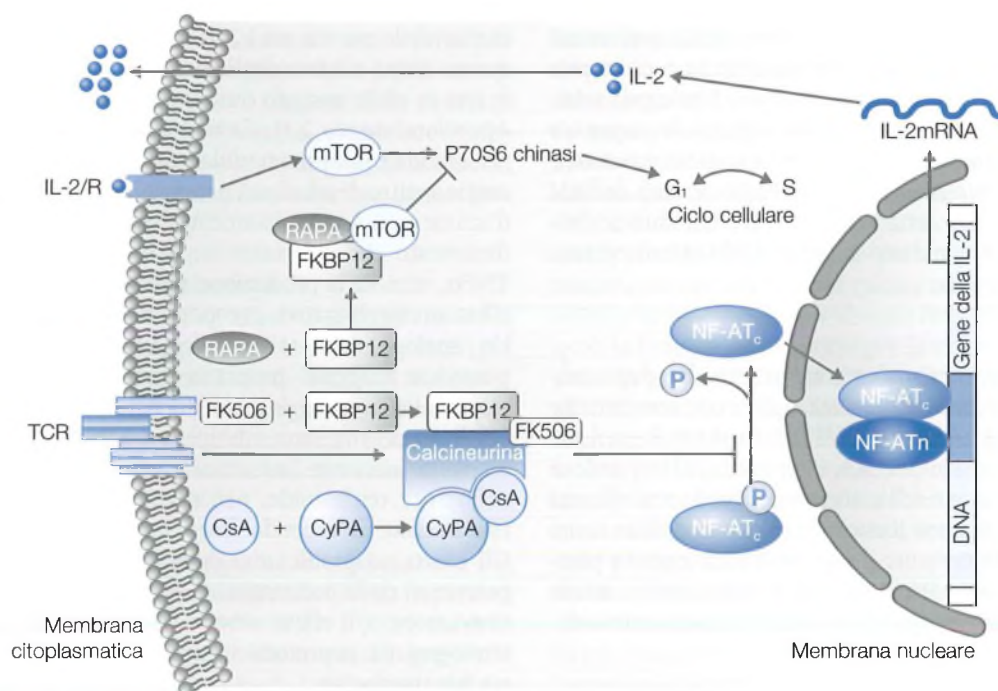


FIGURA 45.2 Meccanismo d'azione di CsA, FK506 e RAPA. A livello citoplasmatico CsA e FK506 legano rispettivamente CyPA e FKBP12. Il complesso CsA/CyPA e FK506/FKBP12 inibisce la calcineurina (fosfatasi Ca²⁺/calmodulina-dipendente) e impedisce la traslocazione nucleare di una subunità citoplasmatica di NF-AT. L'inibizione della traslocazione di NF-AT è causa della mancata trascrizione del gene della IL-2 e di altre citochine. Anche RAPA lega FKBP12 e il complesso RAPA/FKBP12 interagisce con una proteina ad attività chinasi (mTOR). L'inibizione dell'attività chinasi di TOR porta alla mancata attivazione della p70S6 chinasi e di altre chinasi che controllano la transizione G₁-S del ciclo cellulare.

volte nel processo di attivazione, fra cui IL-4 e CD40L (Figura 45.2).

I meccanismi sopra descritti permettono di spiegare almeno in parte l'inibizione dell'attivazione e della proliferazione dei linfociti T. Tuttavia altri meccanismi potrebbero essere coinvolti in questo fenomeno; è stato dimostrato, ad esempio, che il blocco dell'attività fosfatidica della Cn comporta inibizione della trascrizione dei geni di altre citochine oltre la IL-2 e IL-4 (ad esempio, TNF α , IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-17, GM-CSF e IFN γ), inibizione della sintesi del recettore della IL-4 e della catena α del recettore dell'IL-2. CsA e FK506 sono anche in grado di inibire la via di trasduzione del segnale mediata dalle chinasi c-Jun N-terminal (JNK) e p38; queste proteine fanno parte della superfamiglia delle MAP (Mitogen Activated Protein) chinasi (vedi Capitolo 14) e sono coinvolte nella risposta delle cellule T alla stimolazione antigenica. Non è chiaro se questo ulteriore meccanismo sia anch'esso conseguenza della inibizione della Cn o sia Cn-indipendente. All'effetto immunosoppressivo di questi farmaci può inoltre contribuire l'aumento della degradazione dell'mRNA della IL-2 e di altre citochine e fattori di crescita quali, ad esempio, l'IL-3 e il GM-CSF e l'aumento dell'espressione del TGF β 1, che è un potente inibitore della proliferazione delle cellule T e della generazione di linfociti T citotossici; quest'ultimo effetto è indipendente dalla inibizione della Cn. FK506 interagisce anche con il complesso macromolecolare del recettore dei glucocorticoidi (GR); tra le immunofilline

legate dall'FK506 è compresa infatti l'immunofillina P56 (56 kDa) che fa parte del complesso macromolecolare citoplasmatico che lega il GR (Figura 45.3). L'interazione FK506-P56 causa un aumento della traslocazione nucleare del GR con conseguente aumento degli effetti trascrizionali mediati da glucocorticoidi (GC); questo meccanismo può contribuire ulteriormente a determinare l'effetto immunosoppressore dell'FK506 e spiega la presenza di effetti collaterali quali irsutismo. Sulla base dei meccanismi sopra riportati la CsA e l'FK506 sono in grado di inibire sia la risposta di linfociti T che la risposta, T-dipendente, dei linfociti B. Nuove prospettive terapeutiche diverse dall'immunosoppressione sono attualmente ipotizzate per questi farmaci; è stato infatti dimostrato che, in alcuni modelli sperimentali, CsA e FK506 esplicano effetti neurotrofici e neuroprotettivi. Queste osservazioni possono essere spiegate tenendo conto del fatto che le immunofilline, espresse anche a livello neuronale, in queste cellule contribuiscono al controllo della produzione di ossido nitrico, del rilascio di neurotrasmettitori e, mediante interazione con il recettore per la rianodina e per IP $_3$, regolano i livelli intracellulari di Ca $^{2+}$. Più recentemente, è stato dimostrato che CsA e FK506 sono in grado di inibire la crescita miocardica in modelli murini di ipertrofia cardiaca indotta da stimoli diversi; sembra, infatti, che il pathway Cn/NFAT svolga un ruolo fondamentale nello sviluppo di questa patologia. L'importanza di questi studi non deriva solo dal fatto che essi possono contribuire a identificare nuove appli-

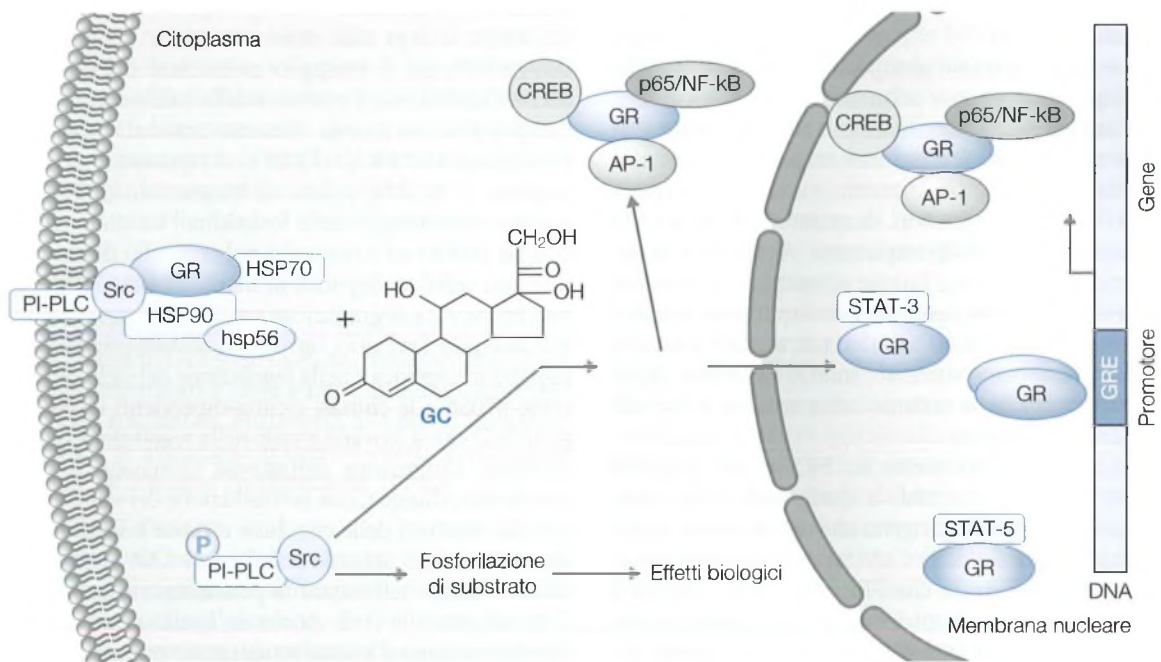


FIGURA 45.3 Meccanismo d'azione dei glucocorticoidi (GC). I GC legano il recettore citoplasmatico (GR) e ne inducono il rilascio dal complesso macromolecolare (che comprende HSP70, HSP90 e immunofillina 56) e la traslocazione nel nucleo. Nel nucleo il GR, in forma dimerica, interagisce con il DNA attivando o inibendo la trascrizione di geni il cui promotore contiene rispettivamente GRE (Glucocorticoid Response Element) o nGRE. L'attività trascrizionale può essere anche regolata mediante interazione negativa (AP-1, CREB, NF-kB) o positiva (STAT-5) con altri fattori di trascrizione. Nei linfociti alla inibizione dell'attività di NF-kB può contribuire anche l'induzione del fattore di inibizione κ B responsabile della inattivazione e localizzazione citoplasmatica di NF-kB. In seguito al legame con lo steroide, proteine ad attività chinasi (PI-PLC, Src) possono dissociare dal complesso recettoriale e mediare effetti biologici rapidi, non genomici.

cazioni terapeutiche per CsA e FK506, diverse dall'immunosoppressione, ma anche a caratterizzare dal punto di vista molecolare e funzionale il loro bersaglio finale, la Cn. La Cn è un enzima eterodimerico, costituito da due subunità, una subunità A (catalitica) e una subunità B (regolatoria); esistono tre isoforme della subunità A, chiamate α , β e γ . Le tre isoforme non hanno la stessa distribuzione tissutale e cellulare, essendo l'isoforma α espressa prevalentemente a livello renale e l'isoforma β prevalentemente nei linfociti T e B; CsA e FK506 sembrano inibire tutte le isoforme. Queste osservazioni permettono di ipotizzare che potrebbe essere possibile progettare inibitori selettivi della isoforma linfocitaria, che risparmiino le cellule renali e che esplicino un effetto immunosoppressivo senza avere la tossicità renale di CsA ed FK-506 (vedi oltre).

Caratteristiche farmacocinetiche

La CsA è un undecapeptide liposolubile, somministrabile per via endovenosa o per via orale, il cui assorbimento è variabile. Il farmaco raggiunge il picco massimo di concentrazione in poche ore (3-4 ore) e ha un'emivita tra le 10 e le 27 ore. È attivamente metabolizzato nel fegato in almeno 18 metaboliti inattivi ed è escreto principalmente con la bile. FK506 può essere somministrato per via iniettiva o orale, anche se l'assorbimento gastrointestinale è variabile e incompleto. L'emivita plasmatica è di circa 12 ore. È metabolizzato nel fegato dal sistema del citocromo P-450A in almeno 9 metaboliti di cui alcuni attivi; è escreto principalmente con la bile.

Principali usi clinici

La CsA è usata in pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo, rene, fegato, cuore e polmone, spesso in associazione con azatioprina, glucocorticoidi e, recentemente, con MFM o rapamicina. È usata inoltre nella GVHD acuta e cronica dove è particolarmente vantaggiosa rispetto agli altri immunosoppressori in quanto non inibisce la rigenerazione del midollo trapiantato. Altri campi di applicazione della CsA sono l'artrite reumatoide (soprattutto nelle forme gravi, in pazienti che non rispondono al metotrexato) e la psoriasi. Altri possibili usi, qualora le terapie classiche non abbiano successo, sono la miastenia grave, le dermatiti atopiche, le malattie infiammatorie intestinali e le sindromi nefrosiche.

Le applicazioni terapeutiche di FK506 nei trapianti d'organo sono sovrapponibili a quelle della CsA; viene anche usato in episodi di rigetto che non possono essere tenuti sotto controllo dalla CsA. Studi clinici preliminari sembrano dimostrare che l'FK506 per uso topico è altamente efficace nella psoriasi, probabilmente grazie alla capacità di modulare negativamente il sistema IL-8/IL-8R e positivamente l'espressione di p53, coinvolti nell'eziopatogenesi di molte malattie caratterizzate da infiammazione e iperplasia cutanea.

Effetti avversi

La relativa specificità del meccanismo d'azione di CsA e FK-506 e la mancanza di effetti su cellule del midollo

osseo in rapida divisione conferiscono a questi farmaci il vantaggio di non favorire l'instaurarsi di infezioni così frequentemente come nel caso dei trattamenti con altri immunosoppressori. L'effetto avverso più rilevante, ed eventualmente limitante la terapia, è la tossicità renale che si manifesta con vasocostrizione, diminuzione della velocità di filtrazione glomerulare, fibrosi interstiziale, danno tubulare. Alcuni di questi effetti sono conseguenza della inibizione della Cn che si accompagna ad aumento della produzione di endotelina-1, con conseguente vasocostrizione, e induzione di apoptosi nelle cellule tubulari; altri, fra cui la fibrosi interstiziale, sono dovuti all'aumentata produzione di TGF β 1. Un problema è, inoltre, rappresentato dalla mancanza di una chiara correlazione tra concentrazione plasmatica ed effetti avversi. È da tenere in considerazione che si possono verificare interazioni di rilevanza clinica nelle varie fasi farmacocinetiche, tra CsA e FK506 e numerosissimi farmaci e che frequentemente, per evitare tossicità dovuta a accumulo di farmaco, è necessario ricorrere al monitoraggio plasmatico (vedi CD: Approfondimento 53.1).

Rapamicina

La rapamicina (RAPA), o sirolimo è un macrolide lipofilo, con struttura analoga a quella di FK506, prodotto dallo *Streptomyces hygroscopicus*, che, come gli inibitori della Cn, lega le immunofiline esplicando un potente effetto immunosoppressivo.

Meccanismo d'azione

La RAPA si lega allo stesso recettore citoplasmatico dell'FK506, ma il bersaglio molecolare del complesso RAPA-FKBP12 non è costituito dalla calcineurina, ma da una proteina con attività chinasi chiamata TOR (*Target Of Rapamycin*) o FRAP (FKBP and rapamycin target). La proteina TOR delle cellule di mammifero (mTOR) appartiene alla famiglia delle fosfatidil inositolo chinasi-chinasi (PIKK) ed è coinvolta nel controllo di numerose funzioni cellulari deputate al mantenimento dell'equilibrio fra sintesi e degradazione proteica; in questo contesto mTOR regola, fra l'altro, l'attività di chinasi coinvolte nella risposta mitogenica e nella regolazione del ciclo cellulare, come p70S6 e le chinasi ciclina-dipendenti (p34cdc2 e p34cdk2) che si trovano a valle nella regolazione del ciclo cellulare. L'inibizione dell'attività chinasi di mTOR interferisce, dunque, con la trasduzione del segnale generato dai recettori delle citochine e causa inibizione della transizione G₁-S del ciclo cellulare; la RAPA è particolarmente efficace nell'inibire la proliferazione delle cellule T in risposta alla IL-2. Anche se quello sopra riportato è il meccanismo d'azione attualmente più accreditato, è tuttavia ben lungi dall'essere definitivamente accertato; alcuni ricercatori sostengono, infatti, che l'effetto della RAPA non sia da correlare all'inibizione diretta dell'attività chinasi di mTOR, ma alla capacità del complesso RAPA-FKBP12 di inibire in modo competitivo il legame a mTOR di molecole non ancora ben identificate, fra cui l'acido fosfatidico, indispensabili per l'attività di mTOR.

Caratteristiche farmacocinetiche

La RAPA è assorbita rapidamente per via orale e ha un'emivita plasmatica di circa 62 ore. È estesamente metabolizzata da enzimi della famiglia CYP3A4, con produzione di numerosi metaboliti di cui alcuni attivi; l'eliminazione è prevalentemente biliare.

Principali usi clinici

La RAPA è usata per la prevenzione del rigetto di trapianto, spesso in associazione con inibitori della Cn e steroidi, o con steroidi ed MFM in pazienti in cui si voglia evitare la nefrotossicità di CsA e FK506. È usata anche nella psoriasi, nelle uveoretiniti e nel lupus eritematoso sistemico. È stato dimostrato, inoltre, che la RAPA inibisce la proliferazione delle cellule muscolari lisce delle arterie; tale proprietà la rende particolarmente efficace nel prevenire l'arteriopatia associata al rigetto cronico di trapianto e per impedire l'occlusione dello stent negli interventi di cardioplastica. Sono in corso studi per valutare la possibile efficacia in malattie cardiovascolari, tumori e diabete. Everolimus, derivato della rapamicina, somministrato per via orale, è indicato per la profilassi del rigetto nel trapianto renale e cardiaco. Everolimus e temsirolimus sono in fase di studio per il trattamento del carcinoma renale.

Effetti avversi

L'effetto avverso più comune è l'iperlipidemia (aumento dei livelli ematici di trigliceridi e colesterolo), che può richiedere trattamento farmacologico. Pur non essendo di per sé nefrotossica, e può potenziare la nefrotossicità della CsA in terapia combinata. Altri effetti avversi importanti sono costituiti da anemia, leucopenia e trombocitopenia (forse dovuti all'inibizione della via di trasduzione del segnale dell'IL-11); come molti altri immunosoppressori può causare insorgenza di neoplasie (soprattutto linfomi) e aumento della suscettibilità alle infezioni.

Corticosteroidi

Da molti anni i corticosteroidi ad azione glucocorticoidea (glucocorticoidi, GC) sono usati nel trattamento di disturbi autoimmunitari e nella terapia immunosoppressiva in pazienti trapiantati. Purtroppo, alla notevole efficacia terapeutica si affiancano numerosi effetti avversi (vedi oltre) che ne limitano l'utilizzazione clinica.

Meccanismo d'azione

Gli effetti dei GC sono principalmente conseguenza dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica mediata da recettori intracellulari che agiscono come fattori di trascrizione. Sono state identificate diverse isoforme del recettore dei GC (GR) che sono espresse in modo diverso in organi diversi e in individui diversi. Splicing alternativi all'esone 9 danno luogo alla formazione di recettori α e β , dove il recettore β può funzionare da dominante negativo. Inoltre 8 metionine, nella porzione di inizio della traslazione, possono causare la generazione di 8 isoforme α e 8 β . Alcune di queste isoforme sono preva-

lentemente citoplasmatiche mentre altre si localizzano nel nucleo. Tutte queste isoforme sono differenzialmente espresse in diversi tessuti e variabilità di espressione è stata riscontrata tra individui diversi.

Le isoforme citoplasmatiche, in particolare il GR α , si trovano nel citoplasma sotto forma di complesso macromolecolare in associazione con diversi coaperoni e altre componenti proteiche (Figura 45.3 e vedi Capitolo 20). L'attivazione dei GR è favorita dal legame del farmaco, ma non esistono dati sul ruolo del legame del farmaco nella regolazione dei diversi isotipi recettoriali. Il numero di isoforme, la diversa espressione in organi e individui diversi rappresenta già di per sé un evidente problema di "variabilità" della risposta al trattamento farmacologico da tenere in considerazione al fine di ottimizzare e individualizzare l'approccio terapeutico. Sono stati inoltre identificati vari polimorfismi dei GR ed è molto interessante notare che particolari polimorfismi recettoriali, oltre a generare variabilità nella risposta al trattamento farmacologico, possono predisporre a malattie.

Nel caso del GR α , in seguito al legame con lo steroide e la conseguente modificazione conformazionale, il GR dissocia dal complesso macromolecolare espone il suo segnale di localizzazione nucleare e trasloca nel nucleo, dove in conformazione dimerica lega sequenze specifiche del DNA (GRE), e stimola la trascrizione di geni specifici (transattivazione). Il legame del dimero recettoriale a sequenze specifiche nGRE può invece causare inibizione trascrizionale. Accanto a questo meccanismo di regolazione trascrizionale cis "diretta", ci sono meccanismi "indiretti", conseguenza dell'interazione del GR con altri fattori di trascrizione, come ad esempio NF- κ B e AP-1, che possono contribuire agli effetti dei GC (transrepressione). Inoltre è stato dimostrato che i GC possono esplicare effetti rapidi, non trascrizionali, ma sempre dipendenti dal legame con il GR e mediati in parte dall'attivazione di Src chinasi associata al recettore (Figura 45.3). Il reale contributo di questi effetti rapidi, non trascrizionali, all'efficacia antinfiammatoria e immunosoppressiva di questi farmaci è ancora da definire.

Un aspetto particolarmente interessante è quello relativo a nuove molecole in grado di discriminare selettivamente tra gli effetti terapeutici e le reazioni avverse, i cosiddetti SEGRA. I risultati sono comunque ancora preliminari e richiedono ulteriori approfonditi studi clinici. Di notevole interesse sono anche le formulazioni ritardo in grado di garantire costanti livelli di farmaco relativamente bassi, con lo scopo di minimizzare le reazioni avverse.

I GC esercitano importanti effetti regolatori sul metabolismo glucidico, sull'equilibrio salino, sulla modulazione dei processi infiammatori e immunitari. In particolare, per quanto riguarda questi ultimi, gli effetti più rilevanti ai fini dell'efficacia terapeutica sembrano essere i seguenti.

- Inibizione della produzione, da parte delle cellule dell'infiltrato infiammatorio, di sostanze chemiotattiche e di fattori che mediano l'aumento della permeabilità capillare, con inibizione del reclutamento di leucociti e monociti nelle aree dove ha sede il processo infiammatorio. È noto che già dopo poche

(4-5) ore dalla somministrazione di una singola dose di farmaco si ha una rapida e transitoria riduzione del numero di linfociti, eosinofili, basofili e monociti circolanti con un corrispondente aumento nel midollo osseo. L'effetto è probabilmente dovuto sia a una ridotta maturazione a livello midollare per inibizione della produzione di fattori di crescita che a fenomeni di redistribuzione in seguito ad alterazione della sintesi di fattori chemiotattici e della sintesi ed espressione di molecole di adesione responsabili della migrazione dei leucociti tra organi linfopoietici primari, secondari e sangue periferico. Linfocitopenia ed eosinopenia possono essere in parte dovuti anche a effetti citotossici diretti a carico di queste cellule mediante induzione di morte apoptotica (vedi oltre). Al contrario, in seguito alla somministrazione di GC, aumenta il numero dei neutrofilii circolanti sia per aumentato rilascio dal midollo osseo, sia per diminuita migrazione extravasale in seguito alla inibizione dell'adesione alle cellule endoteliali; vengono però inibite alcune funzioni basilari di queste cellule, quali la chemiotassi, la fagocitosi e la produzione di anione superossido. L'alterazione della distribuzione linfomonocitaria è rilevante per l'efficacia clinica dei corticosteroidi nel rigetto di trapianto in quanto quest'ultimo dipende innanzitutto dal formarsi dell'infiltrato di linfociti T. Per quanto riguarda le cellule tessutali coinvolte nei processi infiammatori e immunitari, i corticosteroidi riducono il numero dei mastociti e ne inibiscono la degradazione; inibiscono molte, se non tutte, le funzioni dei macrofagi tessutali (presentazione dell'antigene, chemiotassi, fagocitosi) inibendo il rilascio di mediatori solubili (citochine, eicosanoidi, nitrossido) e la sintesi di molecole di adesione (quali ICAM-1, VCAM-1 ed ELAM-1). L'inibizione dell'espressione di molecole di adesione si verifica anche a carico delle cellule endoteliali.

- ▶ Inibizione della sintesi e/o liberazione di:
 - a) acido arachidonico (AA) e suoi metaboliti (PG e leucotrieni, LT, vedi anche Capitolo 39), causata sia dalla inibizione della sintesi di PLA₂ che dall'induzione della sintesi di annessina I (o lipocortina) con attività inibente la PLA₂. All'inibizione della sintesi di PG contribuisce anche l'inibizione della forma inducibile della ciclo ossigenasi (COX-2);
 - b) PAF, *Platelet Activating Factor*; MIF, *Macrophage Inhibiting Factor*, in grado di provocare accumulo di macrofagi nella sede infiammatoria; attivatore del plasminogeno che, convertendo il plasminogeno in plasmina, facilita la migrazione di leucociti nella sede dell'infiammazione;
 - c) numerose citochine (fra cui ad esempio IL-1, -2, -3, -5, -6, -11, -12, -17, TNF α e GM-CSF) e loro recettori (fra cui quelli per la IL-2, -3, -4, -12). Questa azione è dovuta principalmente alla inibizione della attività trascrizionale, ma, in alcuni casi, anche alla aumentata degradazione dell'mRNA. Dal momento che le citochine svolgono un ruolo fondamentale nell'attivare e coordinare la risposta immunitaria

e che molte sono anche fattori di crescita per cellule coinvolte nella risposta, appare evidente che l'effetto sulla produzione di citochine e dei loro recettori è di grande rilevanza ai fini dell'efficacia immunosoppressoria;

- d) alcune chemochine, quali IL-8, RANTES (*Regulated upon Activation T-cell Expressed and Secreted*), MCP (*Monocyte Chemoattractant Protein*)-1, -3 e -4, la cui produzione è aumentata in pazienti con patologie infiammatorie e autoimmunitarie.
 - ▶ Aumento della produzione di TGF β e aumento della produzione (e liberazione in forma solubile) del recettore IL-1_B. Il recettore IL-1_B è un "decoy target", che non è in grado di trasdurre segnale e la sua funzione è probabilmente quella di legare la IL-1 e impedirle di legare il recettore IL-1_A in grado di trasdurre il segnale di attivazione (vedi anche Capitolo 17).
 - ▶ Effetto linfocitotossico (induzione di apoptosi). Questo effetto si manifesta in modo eclatante nell'induzione della aplasia timica (soprattutto in roditori) dovuta appunto alla massiccia diminuzione del numero di timociti dopo somministrazione in vivo di corticosteroidi.

L'effetto linfocitotossico si manifesta sia sulle popolazioni linfocitarie timiche, che sui linfociti T periferici e si pensa contribuisca in modo rilevante all'effetto immunosoppressivo nonché ad alcuni degli effetti avversi dei GC; costituisce, inoltre, il razionale per l'utilizzazione clinica di questi farmaci come agenti antitumorali nel trattamento di leucemie e linfomi. Data la grande rilevanza clinica dell'effetto apoptizzante dei GC, i meccanismi molecolari responsabili di questo fenomeno sono oggi oggetto di intensi studi; tuttavia, benché alcune componenti, come il ruolo della interazione con il GR, la produzione di ceramide, l'attivazione caspatica e l'attività mitocondriale, siano state abbastanza ben caratterizzate, si è ben lontano dall'averne un quadro chiaro e completo di tutta la cascata di eventi innescata dal segnale di morte.

In generale, gli effetti sui linfociti T e sull'immunità cellulare sono molto più marcati degli effetti sui linfociti B e sono quelli principalmente responsabili dell'attività immunosoppressiva dei corticosteroidi.

Caratteristiche farmacocinetiche

La loro elevata lipofilia fa sì che i GC siano efficacemente assorbiti per via orale, mentre i loro esteri, idrosolubili, sono somministrabili per via parenterale. L'applicazione topica prolungata può risultare nell'assorbimento sistemico di quantità significative di farmaco. Sono estesamente metabolizzati, prevalentemente a livello epatico, inizialmente con reazioni di riduzione che producono metabolici inattivi, successivamente con reazioni di coniugazione con solfato o acido glucuronico. I metabolici coniugati sono eliminati prevalentemente per via renale. L'idrocortisone ha una emivita plasmatica di circa 90 minuti; l'emivita degli altri composti è in genere più lunga e varia in funzione della struttura chimica. Da ricordare che, come per la maggior parte dei farmaci che agiscono mediante meccanismi di regolazione trascr-

zionale, l'emivita plasmatica è diversa (molto più breve) dall'emivita biologica.

Principali usi clinici

I corticosteroidi, oltre che nella terapia sostitutiva e nel trattamento di leucemie e linfomi, sono usati come immunosoppressori nella maggioranza delle malattie autoimmunitarie e in pazienti sottoposti a trapianto d'organo. Rappresentano la terapia di scelta e aumentano la sopravvivenza di pazienti affetti da epatite cronica attiva non associata a virus B o non A non B. Ad alte dosi rappresentano il trattamento di scelta (prednisone) nella terapia della dermatomiosite-polimiosite. Sono efficaci nella terapia dell'anemia emolitica autoimmune (in pazienti che rispondono al trattamento) in virtù sia dell'inibizione della sintesi di anticorpi che della inibizione della clearance di globuli rossi con immunoglobuline adese alla loro superficie. Sono in grado, anche se temporaneamente, di ridurre la severità dei sintomi nella sclerosi multipla e sono efficaci (prednisone da solo o in associazione con azatioprina o CsA) nel trattamento della miastenia grave. Insieme alla sulfasalazina vengono usati nella terapia della colite ulcerativa e nel morbo di Crohn. Possono essere usati nello scleroderma nei pazienti con miosite e pericardite, nell'artrite reumatoide e nel lupus eritematoso sistemico. Da soli, o in associazione con ciclofosfamide, sono componente importante del trattamento della maggior parte delle sindromi vasculitiche. I corticosteroidi sono inoltre usati per limitare le reazioni allergiche che possono manifestarsi in seguito a somministrazione di sieri antilinfocitari o anticorpi monoclonali.

Effetti avversi

La tossicità dei corticosteroidi è direttamente correlata ai dosaggi utilizzati e alla durata della terapia. I maggiori effetti avversi in corso di terapia immunosoppressiva con corticosteroidi sono: aumentata suscettibilità alle infezioni, iperglicemia, ipertensione, edema, glaucoma, squilibrio idroelettrolitico, osteoporosi, miopia, redistribuzione del grasso corporeo, fragilità capillare, ulcera, disturbi del comportamento, irritabilità, insonnia, psicosi e alterazioni endocrine quali irsutismo, acne, impotenza: sintomi che caratterizzano il Cushing iatrogeno. Nei bambini la cataratta subcapsulare posteriore e l'inibizione o l'arresto della crescita sono gli effetti avversi più gravi che si manifestano in corso di terapia cronica, come è nella maggior parte dei casi la terapia immunosoppressoria.

Ulteriori complicazioni sono dovute alla sospensione del trattamento dopo terapia prolungata. Questa deve essere condotta gradualmente e per lungo tempo (in alcuni casi fino a un anno) con riduzione progressiva del dosaggio e in ultimo la somministrazione a giorni alterni al fine di minimizzare gli effetti dovuti alla soppressione dell'asse ipofisi-surrene ed evitare che il paziente vada incontro a insufficienza surrenalica acuta.

Appare abbastanza evidente che i dosaggi e gli schemi di trattamento codificati per i diversi GC sono in larga

parte empirici e la letteratura più recente suggerisce la possibilità di usare dosaggi più bassi con riduzione dell'incidenza e della gravità degli effetti avversi.

Anticorpi come immunosoppressori selettivi

Un approccio terapeutico maggiormente selettivo è quello che fa uso di anticorpi diretti contro citochine, recettori per citochine o antigeni di superficie espressi da cellule rilevanti nel funzionamento del sistema immunitario (vedi anche Capitoli 15 e 17). Anticorpi policlonali diretti contro antigeni linfocitari sono in uso da parecchi anni per la prevenzione e il trattamento del rigetto di trapianto; d'altro canto lo sviluppo della tecnologia degli "ibridomi" ha rivoluzionato questo settore e ha aumentato radicalmente la purezza e la specificità degli anticorpi usati per immunosoppressione. Un ulteriore passo avanti è costituito dalla produzione di anticorpi chimerici o umanizzati; l'umanizzazione consiste, in genere, nella sostituzione della porzione Fc e della regione non legante l'antigene del segmento Fab murini con analoghe regioni umane, mantenendo intatta la specificità. Gli anticorpi così ottenuti si sono mostrati sì meno immunogenici, ma non al punto tale da evitare completamente la produzione di anticorpi neutralizzanti. Molto più promettenti sono da questo punto di vista gli anticorpi completamente umani prodotti utilizzando tecnologie quali la selezione di frammenti anticorpali da librerie d'espressione fagiche o l'utilizzazione di topi transgenici che esprimono il locus per le Ig umane e la cui immunizzazione comporta la produzione di anticorpi uomo-anti-uomo la cui immunogenicità è molto limitata.

Anticorpi policlonali

Sieri policlonali antilinfocitari (*AntiLymphocyte Globulin*, ALG) o antitimocitari (*AntiThymocyte Globulin*, ATG) vengono preparati inoculando ripetutamente animali, quali cavallo, coniglio e capra, con linfociti o timociti umani e purificando la frazione immunoglobulinica. Queste preparazioni contengono anticorpi citotossici che legano CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD25, CD44, CD45 e molecole HLA di classe I e II sulla superficie dei linfociti T. In questo modo si ha una inibizione delle funzioni linfocitarie e un depauperamento dei linfociti circolanti. ALG e ATG vengono usati nel trattamento di pazienti trapiantati sia nella induzione dell'immunosoppressione, all'inizio della terapia, sia nel trattamento del rigetto acuto in associazione con altri farmaci immunosoppressori. Per quanto riguarda gli effetti avversi, oltre a quelli legati in generale all'uso di anticorpi (vedi oltre), i sieri policlonali sono caratterizzati da una notevole variabilità per quanto riguarda sia l'efficacia che la tossicità.

Anticorpi monoclonali

Studi clinici hanno dimostrato che anticorpi diretti contro l'antigene CD3 sulla superficie dei linfociti T esplicano un potente effetto immunosoppressivo. Fra questi, un anticorpo monoclonale murino (muromonab-CD3; OKT3) si è dimostrato molto efficace nel trapianto

di rene; è il primo anticorpo monoclonale introdotto nella pratica clinica ed è ormai in uso da parecchi anni. Questo anticorpo agisce, come detto in precedenza, legandosi alla componente CD3 del complesso del TCR e provocando la rapida internalizzazione del complesso stesso. La sua somministrazione è seguita da una rapida deplezione dei linfociti T sia a livello ematico che degli organi linfoidi, quali milza e linfonodi; questo effetto è dovuto sia a morte cellulare (conseguente all'induzione di apoptosi e all'attivazione del complemento), sia a redistribuzione dei linfociti verso organi non linfoidi come i polmoni. OKT3 causa, inoltre, una riduzione delle funzioni dei linfociti T rimanenti, con inibizione della produzione delle principali citochine, compresa la IL-2. OKT3 è attualmente in uso per il trattamento del rigetto acuto di trapianto; recentemente è stato ipotizzato che tale agente sia anche in grado di indurre uno stato di tolleranza immunologica e possa essere usato anche a questo scopo. Sono stati prodotti anticorpi anti-CD3 umanizzati di nuova generazione che con il tempo potranno essere usati in sostituzione di OKT3.

Antagonisti del TNF α

Un ruolo di rilievo nella pratica clinica viene oggi ricoperto dagli antagonisti del TNF α , una citochina proinfiammatoria la cui sintesi è aumentata nel corso di numerose patologie infiammatorie/autoimmunitarie, quali artrite reumatoide, psoriasi e malattie infiammatorie intestinali. L'infliximab è un anticorpo monoclonale chimerico costituito da regioni costanti (Fc) umane e da regioni variabili murine. L'infliximab lega il TNF α , sopprimendo così sia la generazione delle citochine infiammatorie, quali IL-1 e IL-6, che l'espressione di molecole di adesione coinvolte nell'attivazione linfocitaria. Studi clinici in pazienti con morbo di Crohn hanno mostrato che questo agente è in grado di ridurre la sintomatologia in un numero considerevole di pazienti refrattari a tutti gli altri farmaci. Attualmente l'uso di infliximab è approvato per il trattamento del morbo di Crohn, dell'artrite reumatoide, della spondilite anchilosante e dell'artrite psoriasica. Per l'artrite reumatoide è stato approvato l'uso di un nuovo agente, adalimumab, un anticorpo monoclonale di origine umana che lega il TNF α umano. Adalimumab rappresenta il primo anticorpo monoclonale completamente umano introdotto in terapia e la sua immunogenicità è molto più bassa di quella degli altri anticorpi attualmente in uso.

Pur non essendo un anticorpo monoclonale, vengono riportate in questo paragrafo le caratteristiche di un altro antagonista del TNF α , l'etanercept. L'etanercept è una proteina chimerica composta da regioni costanti delle IgG umane fuse con il recettore del TNF α ; esso lega il TNF α e ne previene l'interazione con il suo recettore. Questo farmaco è approvato per l'uso nell'artrite reumatoide, nell'artrite psoriasica e in alcune forme di artrite giovanile. Altre indicazioni sono in fase di valutazione. Gli antagonisti del TNF α hanno diversa emivita plasmatica e vengono in genere somministrati con diverso dosaggio per via sottocutanea 1 o 2 volte alla settimana.

Alcuni agenti sono ancora in fase di sperimentazione, fra questi certolizumab che è un nuovo anticorpo monoclonale (frammento FAB) umanizzato in grado di neutralizzare il TNF α sia solubile che di membrana; questo è un anticorpo coniugato con polietilenglicole in sperimentazione per il trattamento del morbo di Crohn. Diverse reazioni avverse gravi caratterizzano l'uso degli antagonisti del TNF α quali reazioni all'infusione o all'incolo, comprendenti febbre, dispnea e ipotensione, infezioni gravi, soprattutto delle vie respiratorie (inclusa riaccensione di tubercolosi e di infezioni da germi opportunisti), malattie linfoproliferative, lupus iatrogeno e aggravamento dell'insufficienza cardiaca.

Altri farmaci biologici con attività immunomodulante

Anticorpi diretti contro il recettore della IL-2 (CD25) sono rappresentati dal daclizumab (anticorpo umanizzato) e dal basiliximab (anticorpo chimerico). Essi legano con alta affinità la subunità α del recettore della IL-2 espressa sulla superficie dei linfociti T attivati, bloccando tutti gli effetti mediati dalla IL-2. Sono usati nella profilassi del rigetto di trapianto in associazione con GC e inibitori della calcineurina, con o senza azatioprina o MFM.

Oltre a quelli sopra riportati, numerosi altri anticorpi monoclonali fanno oggi parte dello scenario terapeutico, alcuni di essi in fase di sperimentazione clinica avanzata, altri già approvati per l'uso. Si possono citare, ad esempio, il rituximab, anticorpo chimerico, uomo-topo, che si lega al CD20 sui linfociti B ed è usato in alcuni tipi di linfoma. Alcune proteine di fusione CTLA-4Ig, quali abatacept e belatacept, sono indicati nel trattamento rispettivamente dell'artrite reumatoide e nella prevenzione del rigetto di trapianto.

Lalefacept è una proteina di fusione ricombinante in grado di bloccare il segnale costimolatorio del CD2 e approvata per il trattamento della psoriasi. Lefalizumab è, invece, un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro la subunità α dell'LFA-1 (CD11a) che impedisce l'interazione fra LFA-1 e ICAM-1, interferendo così con l'attivazione delle cellule T e con la migrazione dei linfociti T citotossici. Esso è approvato per il trattamento delle forme gravi di psoriasi nell'adulto. Per la medesima utilizzazione è stato approvato recentemente il tocilizumab, un anticorpo monoclonale umano diretto contro il recettore della IL-6. Lomalizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato anti-IgE, è approvato per il trattamento dell'asma allergico in pazienti che non rispondono ai corticosteroidi inalatori.

Problemi legati all'uso di anticorpi

Gli effetti avversi più frequentemente riscontrati in seguito all'uso di anticorpi sono rinite, febbre, difficoltà respiratoria, ipotensione, disturbi gastrointestinali, tremori, sindromi linfoproliferative e linfomi. Nel caso degli anticorpi anti-CD3 è stata inoltre descritta una sindrome a carico del sistema nervoso centrale (con emicrania, fotofobia e febbre), probabilmente causata dal

rilascio di numerose citochine. Il trattamento con anticorpi monoclonali è ulteriormente complicato dalla loro immunogenicità e quindi dalla produzione di anticorpi neutralizzanti, prodotti dall'ospite trattato, in grado di inibirne l'efficacia terapeutica. Per tale ragione, come già detto, è necessario ricorrere all'uso di anticorpi "umanizzati" (ibridi uomo/animale) o completamente umani, opportunamente preparati al fine di ridurne, se non di eliminarne, l'antigenicità.

Farmaci immunostimolanti

La immunostimolazione trova il suo naturale impiego in tutte le malattie da immunodeficienza e nelle infezioni virali e batteriche. Inoltre gli immunostimolanti sono impiegati, sia in modelli animali che in clinica, nella terapia dei tumori. Sebbene non siano completamente chiari i meccanismi responsabili dei risultati ottenuti con terapia immunostimolante nelle malattie neoplastiche, né ci sia concordanza sull'efficacia clinica di tale approccio, esso trova ragione teorica nella immunodepressione indotta dalla malattia e si basa sul presupposto che le cellule neoplastiche, a causa di specifiche mutazioni, presentano peptidi associati all'MHC, in grado di determinare uno stato di tolleranza (anergia) piuttosto che stimolare la risposta immunitaria. Questo stato di anergia è dovuto almeno in parte alla mancata stimolazione di cellule T helper CD4⁺ da parte della cellula tumorale e quindi alla carenza di citochine. La stimolazione della produzione di citochine o la loro somministrazione potrebbe abolire lo stato di tolleranza e risultare curativa stimolando la produzione di altri fattori solubili coinvolti nella risposta immunitaria.

Prodotti di derivazione microbica, estratti timici e composti chimicamente definiti

Questo gruppo di immunostimolanti, di difficile classificazione, è rappresentato da una serie di composti in grado di stimolare in modo aspecifico la risposta immunitaria. Vi sono compresi un gran numero di preparati alcuni dei quali sono qui riportati.

Prodotti derivati da microrganismi

- Glicani preparati da estratti di funghi da cui sono derivati immunostimolanti quali il glucano e altri polisaccaridi in grado di attivare i macrofagi con conseguente aumento della attività microbica e tumoricida e della produzione di IL-1, TNF α e di alcuni CSF.
- Lipopolisaccaridi batterici, quali il lipide A, in grado di stimolare linfociti B e macrofagi.
- BCG, e preparati della parete cellulare di micobatteri quali il muramil dipeptide (MDP), in grado di stimolare cellule NK e linfociti T. Per il BCG è stata riportata una certa efficacia, in combinazione con la chemioterapia, nella terapia del cancro della vescica. Inoculato in diversi tipi di neoplasie è in grado di far regredire la lesione neoplastica senza però dare im-

munizzazione sistemica. Può causare lesioni cutanee, ulcerazione e febbre.

- Derivati batterici con struttura polimerica in grado di indurre IFN e di stimolare macrofagi e cellule NK (questi comprendono gli eteri vinilici dell'acido maleico e i polinucleotidi).

Estratti timici

Estratti timici crudi composti da peptidi (generalmente classificati come ormoni timici) sono in grado di stimolare le funzioni dei linfociti T e aumentare la resistenza alle infezioni e alla crescita tumorale. La loro efficacia clinica è dubbia.

Immunostimolanti con struttura chimica definita

La ricerca mirante a ottenere composti puri ha portato alla formulazione di una serie di prodotti chimicamente definiti.

- Derivati dell'MDP. Questi composti provocano attivazione macrofagica e secrezione di CSF, IL-1 e TNF α . Hanno azione adiuvante, aumentano la resistenza a infezioni e stimolano la generazione di granulociti.
- Analoghi del lipide A, quali i derivati monofosforilati, di potenziale interesse clinico.
- Bestatina, un dipeptide in grado di attivare cellule NK e macrofagi ed efficace nelle recidive e nell'aumentare la sopravvivenza di pazienti affetti da leucemie acute non linfocitiche.
- Peptidi timici. Sono disponibili peptidi timici di sintesi quali: la timopentina, la timulina, la timosina- α_1 e il fattore timico umorale in grado di stimolare la generazione e la attivazione di linfociti T. La timosina- α_1 è stata usata in pazienti affetti da epatite cronica attiva.
- Farmaci timomimetici. Questi comprendono:
 - a) levamisolo, in grado di stimolare le funzioni dei linfociti T in vivo, specialmente in pazienti immunodepressi, dei macrofagi e dei neutrofilii; è efficace, in combinazione con 5-fluorouracile, nel trattamento del carcinoma del colon;
 - b) ditiocarb, in grado di ridurre l'insorgenza di infezioni in pazienti affetti da HIV;
 - c) inosina e suoi derivati, in grado di stimolare la attività di linfociti T e di ridurre l'incidenza di infezioni collaterali in pazienti affetti da HIV.
- Induttori di IFN. Questi comprendono:
 - a) PolyAU, in grado di aumentare la reattività di cellule NK;
 - b) derivati del PolyIC, in grado di stimolare l'attività di cellule NK e di interesse terapeutico nel trattamento di tumori del rene.

A parte il caso del levamisolo nel carcinoma del colon e il caso del BCG nel cancro della vescica, l'esperienza clinica, relativa agli immunostimolanti sopra descritti, può ben essere definita deludente. Alcune delle loro azioni sono comunque dovute alla induzione di citochine e con la disponibilità di citochine ricombinanti c'è attualmente la tendenza a sostituire tali composti con le citochine stesse usate da sole o in combinazione tra loro.

Le citochine

Le citochine sono fattori solubili, di natura glicoproteica, che presiedono allo sviluppo fisiologico di cellule effettrici del sistema immunitario e alla regolazione della risposta immunitaria. Per tale ragione in questi ultimi anni è stata rivolta grande attenzione all'uso clinico di citochine come farmaci immunostimolanti. È stato descritto un gran numero di interleuchine (IL-1, IL-2 ecc.), tre diverse famiglie di interferoni ($\alpha\beta\gamma$), diversi fattori di crescita (PDGF, EGF, TGF ecc.), diversi *Colony Stimulating Factors* (GM-CSF, G-CSF, M-CSF ecc.) e un gran numero di fattori chemiotattici. Teoricamente tutte le citochine, per il ruolo fisiologico che giocano nella regolazione della risposta immune, devono essere considerate dei potenziali farmaci immunostimolanti (o immunosoppressori). Tuttavia sono necessari ancora studi clinici per definire la reale possibilità di introdurre in terapia le citochine come farmaci immunostimolanti. Vengono qui citate le citochine ricombinanti che hanno attualmente un impiego clinico (vedi anche Capitolo 15).

Interleuchina-2

L'IL-2 è una glicoproteina di 133 amminoacidi di 15,4 kDa i cui effetti di attivazione e stimolazione della proliferazione sono legati alla interazione con specifici recettori. Il sistema recettoriale della IL-2 (IL-2R) è composto da tre diverse proteine di membrana dette α , β e γ (Figura 45.4). La catena α (55 kDa), che è peculiare dell'IL-2R, è espressa solo in linfociti T attivati; la catena β (70 kDa), che è comune al recettore dell'IL-15, è

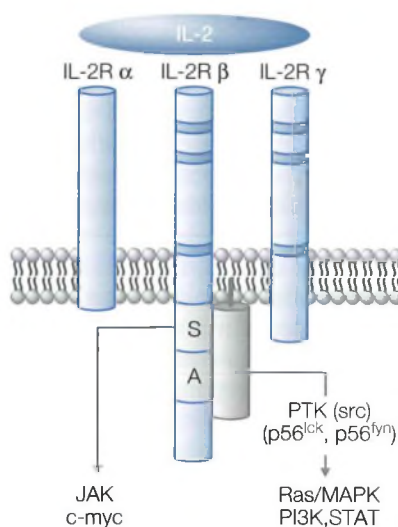


FIGURA 45.4 Recettore per la IL-2 (IL-2R). Le tre catene del recettore, α , β e γ , possono essere espresse in diverse combinazioni e generare recettori dimerici o trimerici a diverso grado di affinità per IL-2. Il recettore trimerico è dotato di alta affinità. Le catene β e γ sono coinvolte nel segnale proliferativo. La catena β è essenziale per la trasduzione del segnale e presenta una regione ricca di serine (S) importante per l'induzione di *myc* e l'attivazione di JAK e una porzione acida (A) importante per la trasduzione del segnale attraverso l'attivazione di tirosinchinasi.

espressa costitutivamente in linfociti T CD8⁺ e l'espressione è ulteriormente aumentata in cellule attivate. La catena γ , che è comune ai recettori di altre citochine (IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15) è espressa costitutivamente in cellule linfoidi. La combinazione delle tre diverse catene, in forma trimerica e/o dimerica, comporta la formazione di vari recettori a diverso grado di affinità. Il recettore trimerico ($\alpha\beta\gamma$) è quello a più alta affinità. La catena β è responsabile della trasduzione del segnale proliferativo ma solo se è espressa anche la catena γ . Probabilmente l'interazione della catena β con la IL-2, oltre a stimolare l'espressione della catena α , induce anche l'assemblaggio delle tre catene a formare il recettore ad alta affinità. A differenza dei recettori di altre citochine (CSF-1, PDGF, EGF ecc.), il recettore della IL-2 non presenta attività chinasi intrinseca; esso è tuttavia in grado di indurre una rapida fosforilazione in tirosina di diverse proteine, tra cui la sua stessa catena β . Ciò avviene perché la catena β contiene una specifica porzione citoplasmatica (detta acida) che le consente di interagire e attivare tirosinchinasi della famiglia *src* (p56^{lck} e p59^{lyn}) la cui attivazione correla con quella di diverse vie di trasduzione, fra cui la via che coinvolge la famiglia delle Janus chinasi (JAK) e le proteine STAT (*Signal Transducer and Activators of Transcription*), che comprendono numerosi fattori di trascrizione; quella di Ras e MAP chinasi e quella di fosfoinositolo 3 fosfato chinasi (PI3K).

La IL-2 ha importanti effetti:

- sulla proliferazione, in quanto favorisce l'entrata in G₁ e l'attivazione di prodotti genici necessari per la progressione in fase S. In questo modo stimola la proliferazione di linfociti T, B e di cellule NK;
- sulla attivazione, provocando un aumento della espressione dell'IL-2R, della produzione di anticorpi da parte di linfociti B, della capacità tumoricida di linfociti T e cellule NK (aumento della attività LAK), della produzione di IFN γ a sua volta responsabile della attivazione di macrofagi e granulociti;
- sulla sopravvivenza, inibendo e/o potenziando la morte apoptotica di linfociti.

Principali usi clinici

La IL-2 usata in clinica è la forma ricombinante umana (adesleukin), che differisce dalla nativa per la sostituzione di alcuni amminoacidi e per non essere glicosilata, ma che media gli stessi effetti biologici. La IL-2 trova applicazione terapeutica come immunostimolante, somministrata per via sistemica, regionale o locale, nel trattamento di pazienti affetti da malattie neoplastiche o da deficit immunitari. Per quanto riguarda le malattie neoplastiche la IL-2 è attualmente usata da sola o in associazione con IFN α .

A causa della breve emivita della IL-2, la maggior parte degli schemi terapeutici prevede l'infusione continua o la somministrazione di dosi multiple intermittenti. Attualmente sono in corso di sperimentazione protocolli che prevedono l'uso di IL-2 incapsulata in liposomi o coniugata con polietilene glicole allo scopo di prolungarne l'emivita e facilitarne l'accesso alle cellule immuni.

Effetti avversi

Uno dei limiti della terapia con IL-2 è rappresentato dagli effetti tossici conseguenti al trattamento, soprattutto ad alti dosaggi, tra cui il più importante è la "capillary leak syndrome" probabilmente causata dall'induzione del rilascio di altre citochine quali gli interferoni e il TNF α e la cui conseguenza più eclatante è l'edema polmonare. Sono inoltre descritti altri effetti collaterali quali ipotensione, tossicità cardiovascolare, renale ed ematologica, neurotossicità, febbre, nausea e vomito, diarrea, senso di fatica e di malessere, ed eruzioni cutanee.

Interferoni

Gli interferoni (IFN) sono citochine con proprietà antivirali, immunomodulanti e antiproliferative. L'IFN α è principalmente di origine leucocitaria, l'IFN β è principalmente prodotto da fibroblasti e cellule epiteliali, mentre l'IFN γ è prodotto da linfociti T e cellule natural killer in risposta a stimoli antigenici, mitogeni e citochine. Le varie classi di IFN hanno proprietà biologiche diverse: l'IFN α ha potenti azioni antivirali e antitumorali, mentre l'IFN γ ha effetti immunomodulanti più pronunciati (ad esempio, attivazione di macrofagi e monociti, induzione dell'espressione di molecole di istocompatibilità di classe II, aumento dell'attività citotossica delle cellule natural killer e dei linfociti T).

Gli effetti più importanti per i quali gli interferoni vengono usati in terapia sono quello antitumorale e quello antivirale. I meccanismi con i quali viene espletata l'azione antitumorale non sono del tutto chiariti, anche se sembrano rilevanti a tal fine l'inibizione dell'espressione di proto-oncogeni quali c-myc, c-fos, c-H-ras, l'aumento dell'espressione da parte delle cellule tumorali di antigeni che ne favoriscono il riconoscimento e l'eliminazione, la diminuzione della disponibilità di nutrienti intracellulari come il triptofano.

Principali usi clinici

Il trattamento con IFN α è efficace in alcuni tumori del sistema immunitario come la leucemia a cellule capellute, il linfoma cutaneo a cellule T, la leucemia linfatica cronica ai primi stadi, i linfomi non-Hodgkin a grado basso e intermedio di malignità; viene inoltre usato nel carcinoma del colon, nel cancro della vescica, nei tumori genitali da papillomavirus. Risultati terapeutici più modesti sono inoltre ottenibili nel mieloma multiplo, nel melanoma metastatico e nel sarcoma di Kaposi associato ad AIDS. L'IFN γ viene usato nella malattia granulomatosa cronica e nelle forme metastatiche del carcinoma renale e ovarico, nel melanoma e nei linfomi T. Sia l'IFN α che l'IFN γ sono attivi nella leucemia mieloide cronica.

I risultati sopra riportati sembrano dovuti alla azione antiproliferativa diretta su cellule tumorali piuttosto che alla possibile attività immunostimolante.

L'IFN β è stato recentemente introdotto nella terapia della sclerosi multipla (MS) con risultati positivi. Sebbene il meccanismo responsabile dell'effetto terapeutico non sia stato chiarito questo potrebbe comunque essere dovuto all'attività antivirale o all'attività antiproliferativa dell'IFN β

esercitata su linfociti autoreattivi, alla modulazione della produzione di altre citochine, alterata nei pazienti affetti da MS, o ancora a effetti su fattori di trascrizione (quale l'NF- κ B) coinvolti nell'attivazione linfocitaria.

Effetti avversi

La manifestazione più comune è la sintomatologia di tipo influenzale, con febbre, mialgia, cefalea, raffreddore e disturbi gastrointestinali, caratteristica delle fasi iniziali del trattamento, che è in genere tenuta sotto controllo con antipiretici (paracetamolo) e regredisce con il procedere della terapia. L'effetto collaterale più grave limitante la terapia con alte dosi per via sistemica è la depressione midollare con trombocitopenia e granulocitopenia. Si possono inoltre avere neurotossicità, cardiotoxicità e alterazioni della funzionalità epatica.

G-CSF, GM-CSF e IL-3

Un aspetto particolare, ai margini della terapia immunostimolante, è quello dell'uso di fattori di crescita ematopoietici quali G-CSF, GM-CSF e IL-3, al fine di ridurre la leucocitopenia causata dal trattamento antitumorale con chemioterapici, accelerare la rigenerazione mieloide e ridurre il rischio di infezioni. Questo tipo di terapia potrebbe inoltre permettere di aumentare le dosi dei chemioterapici.

IL G-CSF è approvato per l'uso nella profilassi della neutropenia indotta da chemioterapia in quanto è in grado non solo di accelerare la proliferazione e la differenziazione dei granulociti, ma anche di migliorare la funzionalità delle cellule mature (ad esempio, chemiotassi e citotossicità anticorpo-dipendente).

Il GM-CSF è usato nel trapianto di midollo osseo autologo e dopo chemioterapia intensiva per favorire l'attecchimento e accelerare il recupero mieloide. È anche disponibile il prodotto di coniugazione del GM-CSF con glicole polietilenico, più resistente alle proteasi e con un'emivita più lunga, ma probabilmente meno efficace sulle cellule midollari immature.

Nuove molecole sembrano aprire importanti prospettive all'uso dei fattori di crescita come sostanze di rilevanza terapeutica nel trapianto di midollo e nella chemioterapia antitumorale; fra queste la trombopoietina, una citochina ricombinante umana che stimola la megacariocitopoiesi e un prodotto di fusione della IL-3 con GM-CSF che aumenta tutti gli elementi circolanti comprese le piastrine.

Citochine come immunoadjuvanti

L'uso come adjuvanti rappresenta un'altra possibile applicazione delle citochine mirante ad aumentare la risposta immunitaria. Ad esempio, IFN α e IFN γ , somministrati in volontari sani, hanno mostrato una attività adjuvante in vaccinazioni contro il plasmodium falciparum. L'IL-2, l'IFN α e l'IFN γ hanno mostrato una chiara azione adjuvante quando associati a vaccini contro il virus dell'epatite B, riscontrabile in un aumentato titolo anticorpale rispetto al trattamento con il solo vaccino. Anche se sono necessari ulteriori studi al fine di valutare la reale applicabilità clinica dell'uso di citochine come adjuvanti,

gli esempi sopra riportati sono rappresentativi di uno dei futuri approcci terapeutici con citochine nel campo della immunostimolazione.

Nuovi bersagli molecolari nella terapia immunosoppressiva

Inibitori delle fosfodiesterasi 4 e delle p38 MAP chinasi

Partendo dal presupposto che l'inibizione della produzione di citochine infiammatorie, e in particolare di TNF α , possa portare beneficio in tutte quelle situazioni patologiche in cui si ha accumulo delle medesime, si è tentato di sintetizzare composti selettivi in grado di inibire la produzione di TNF α . Queste ricerche hanno portato alla produzione di diversi tipi di molecole che bloccano la produzione di citochine con meccanismi diversi. Un primo gruppo agisce inibendo le fosfodiesterasi 4 (PDE4). Questi enzimi sono responsabili della trasformazione del cAMP in AMP e la loro inibizione comporta un accumulo intracellulare di cAMP e una elevata attività della proteina chinasi A (PKA). L'inibizione della PDE4

e il conseguente aumento di cAMP comportano il blocco dell'attivazione di fattori di trascrizione, compreso NF- κ B, con inibizione della produzione di mediatori dell'infiammazione, fra cui il TNF α . Inibitori selettivi della PDE4, cilomilast e rufomilast, possono essere efficaci nelle patologie infiammatorie delle vie respiratorie. D'altro canto è noto che la via di trasduzione che porta alla produzione di TNF α è anche regolata da proteine della famiglia delle MAP chinasi e in particolare dalle p38MAP chinasi; queste appartengono a un gruppo di proteine che fosforilano residui di serina e di treonina di cui fanno parte anche ERK e JNK. Composti che inibiscono le p38 MAP chinasi inibiscono la produzione non solo di TNF α , ma anche di IL-1 e ossido nitrico. I composti più promettenti di questa classe (SCIO-469, VX-702 e SB-203580) sono attualmente in fase di sperimentazione nell'artrite reumatoide e nella malattia infiammatoria intestinale. Da notare che tutti questi farmaci sono piccole molecole somministrabili per via orale, molto diffusibili (alcune attraversano la barriera ematoencefalica e questo può essere alla base di effetti avversi a carico del sistema nervoso), non immunogeniche e con un costo di produzione notevolmente più basso rispetto ad altri antagonisti del TNF α quali anticorpi monoclonali o peptidi solubili.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'evoluzione delle conoscenze relative ai meccanismi patogenetici delle malattie infiammatorie/autoimmunitarie apre a una continua proposta di nuovi farmaci immunomodulanti; nello stesso tempo farmaci ormai in uso da decenni conservano un ampio e importante valore terapeutico.
- ▶ Un maggiore impegno negli studi molecolari finalizzati alla scoperta dei meccanismi realmente importanti nello sviluppo delle malattie del sistema immunitario potrebbe fornire indicazioni per nuovi farmaci efficaci, sicuri e innovativi.
- ▶ Ulteriori studi miranti a una più profonda conoscenza dei meccanismi patogenetici e del profilo farmacodinamico dei medicinali sono necessari per un uso razionale di alcuni dei farmaci già disponibili, con evidenti vantaggi per il malato.

Bibliografia essenziale

- ▶ Kopf M, Bachmann M, Marsland B. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:703-18.
- ▶ Lowenberg M, Verhaar A, Brink GR, Hommes DW. Glucocorticoid signal: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med* 2007;13:158-63.
- ▶ Musson RE, Smith NP. Regulatory mechanisms of calcineurin phosphatase activity. *Curr Med Chem* 2011;18:301-15.
- ▶ Revollo JR, Cidlowski JA. Mechanism generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann NY Acad Sci* 2009;11:167-78.
- ▶ Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XFS. Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 2007;12:112-24.
- ▶ Tracey D, Klareskog L, Sasso EH et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008;117:244-79.

Meccanismi d'azione dei farmaci antinfettivi

CAPITOLO

46

Francesco Scaglione

Obiettivi formativi

- Acquisire le basi teoriche e pratiche per comprendere i meccanismi molecolari d'azione dei farmaci antibatterici, antimicotici e antivirali
- Acquisire le basi per comprendere i meccanismi molecolari della resistenza ai farmaci antibatterici, antimicotici e antivirali
- Acquisire nozioni per saper classificare le varie classi di farmaci in base al bersaglio e al meccanismo d'azione

Il ventesimo secolo è stato caratterizzato dalla nascita della terapia antimicrobica al punto di farlo definire da più parti "l'era antibiotica". L'identificazione di quasi tutti i germi patogeni, dei loro meccanismi patogenetici e l'introduzione dei farmaci antimicrobici hanno portato oggi al controllo delle malattie infettive, impensabile fino alla metà del secolo scorso. Con l'uso di questi farmaci si sono, tuttavia, introdotti altri problemi farmacologici come la resistenza ai farmaci, le interazioni farmacologiche e la tossicità. I problemi sono legati sia all'uso non appropriato che all'abuso; si stima, infatti, che vengano usati nel mondo 100.000 tonnellate all'anno di antibiotici.

Anche se i farmaci antimicrobici sono un ampio gruppo caratterizzato da strutture diverse con differenti meccanismi d'azione contro batteri, virus, funghi e parassiti, possiamo, tuttavia, sviluppare generalizzazioni su importanti questioni che concernono l'uso di agenti antimicrobici. In questo capitolo verranno esaminati le classi generali di farmaci antimicrobici, i loro meccanismi di azione e i meccanismi di resistenza. Verranno anche brevemente discussi i principi per un appropriato uso degli antibiotici.

I microrganismi di importanza medica rientrano in tre categorie: batteri, virus, funghi. Pertanto affronteremo questa trattazione classificando i farmaci sulla base del microrganismo sui quali i farmaci sono attivi, in modo da avere: 1) antibatterici, 2) antifungini, 3) antivirali. All'interno di ciascuna di queste grandi categorie, i farmaci sono ulteriormente classificati per le loro caratteristiche chimiche e le proprietà biochimiche. Le molecole dei farmaci antimicrobici dovrebbero essere considerate

come ligandi i cui recettori sono proteine microbiche che venendo inattivate dal legame con il farmaco determinano la morte del microrganismo. La caratteristica saliente degli antimicrobici è la selettività del bersaglio sulla cellula microbica rispetto alla cellula degli organismi superiori.

Farmaci antibatterici

Un antibiotico per poter esplicare la sua attività antibatterica deve essere in grado di:

- entrare nella cellula batterica e raggiungere il sito d'azione;
- legarsi al bersaglio che è coinvolto in un processo essenziale per la vitalità cellulare;
- inibire il processo in cui il bersaglio svolge un ruolo fondamentale;
- non essere modificato all'interno della cellula batterica.

I farmaci antibatterici vengono distinti in batteriostatici e battericidi a seconda che essi siano in grado semplicemente di bloccare la duplicazione batterica o, invece, provocino la morte del microrganismo. Tuttavia la differenza tra i due termini è in qualche modo arbitraria in quanto questa proprietà dipende da:

- fase di crescita batterica (ad esempio, la penicillina è battericida solo su cellule in fase di replicazione);
- concentrazione dell'antibiotico;
- specie batterica su cui la molecola agisce.

Anche in clinica spesso non si riscontrano differenze di attività tra un batteriostatico e un battericida. Tuttavia

TABELLA 46.1 Meccanismo d'azione di antibiotici di uso clinico

Antibiotici	Meccanismo d'azione	Esempi di farmaci	
Composti che agiscono sulla parete cellulare e sulla integrità delle membrane			
β-lattamici	Penicilline	Inibizione della sintesi della parete cellulare a livello delle transpeptidasi (PBP)	Penicillina G, ampicillina, ticarcillina, piperacillina, amoxicillina
	Cefalosporine	Come sopra	Cefotaxima, cefalexina, cefacloro, ceftriaxone, ceftazidime
	Cefamicine	Come sopra	Cefoxitima, cefbuperazone
	Carbapenemi	Come sopra	Imipenem, meropenem
	Monobactami	Come sopra	Aztreonam
	Clavam	Inibizione di β-lattamasi	Acido clavulanico (+amoxicillina)
	Acido penicillanico sulfone		Sulbactam (+ampicillina), Tazobactam (+piperacillina)
Peptidici	Glicopeptidi	Inibizione della sintesi della parete cellulare mediante legame al D-Ala-D-Ala del precursore del peptidoglicano	Vancomicina, teicoplanina, telavucina
	Polipeptidi	Prevenzione della defosforilazione e rigenerazione del carrier dei lipidi necessario per la biosintesi del peptidoglicano	Bacitracina
	Polipeptidi ciclici	Alterazione della membrana cellulare	Polimixina, colistina
	Lipopeptidi	Depolarizzazione delle membrane batteriche e inibizione di sintesi proteica	Daptomicina
Fosfomicina	Inibizione di MurA nel primo step nella sintesi del peptidoglicano	Fosfomicina	
Cicloserina	Inibizione della D-alanina racemasi e della D-alanil-D-alanina sintetasi	Cicloserina	
Antibatterici attivi sulla sintesi degli acidi nucleici			
Chinoloni	Inibizione della replicazione del DNA mediante interazione con DNA girasi e topoisomerasi IV	Acido nalidixico, norfloxacina, pefloxacina, ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina	
Cumarine	Inibizione della sintesi del DNA mediante legame alla subunità B della DNA girasi	Novobiocina	
Inibitori della diidrofolato reductasi	Inibizione del metabolismo dell'acido folico	Trimetoprim	
Sulfonamidi	Inibizione o conversione dell'acido para-amminobenzoico (PABA) a diidrofolato	Sulfametossazolo, sulfadiazina, dapsona, acido para-amminosalicilico (PAS)	
Rifamicine	Inibizione della sintesi dell'RNA mediante formazione del complesso DNA-RNA polimerasi	Rifampicina, rifabutina, rifaximina	
Inibitori della sintesi proteica			
Tetracicline	Legame alla subunità 30S del ribosoma e blocco dell'allungamento del peptide	Tetraciclina, doxiciclina, minociclina	
Macrolidi	anelli a 14, 15 membri	Legame alla subunità 50S del ribosoma e blocco della traslocazione del peptide	Eritromicina, claritromicina, azitromicina, roxitromicina, josamicina, miokamicina, spiramicina
	anello a 16-membri	Come sopra	
Lincosamidi	Come sopra	Lincomicina, celindamicina	
Streptogramine (A e B)	Legame alla subunità ribosomiale 50S e inibizione della traslocazione del peptide e della formazione di nuovi legami peptidici	Pristinamicina, quinopristin-dalfopristin	
Aminoglicosidi	Legame irreversibile alla subunità 30S del ribosoma, impedisce la traduzione di mRNA introducendo errori nelle proteine	Streptomicina, neomicina, kanamicina, tobramicina, gentamicina, amikacina, netilmicina, isepamicina	
Fusidani	Inibizione del fattore di allungamento G (EF-G). Assenza di traslocazione del peptide	Acido fusidico	
Acido pseudomonico	Inibizione della isoleucina tRNA sintetasi	Mupirocina	
Cloramfenicolo	Legame al ribosoma nel sito del "centro delle peptidil transferasi" e blocco della traslocazione peptidica	Cloramfenicolo	
Ossazolidinoni	Legame alla subunità 50S inibendo la formazione del complesso d'inizio e bloccando la traduzione del mRNA	Cloramfenicolo	
Antibiotici che causano danni a livello macromolecolare			
Nitrofurani	Danni alle proteine e agli acidi nucleici mediante meccanismi multipli che comprendono la produzione di radicali idrossido e formazione di addotti al DNA	Nitrofurantoina	
Nitroimidazoli	Danni sul DNA dei radicali liberi prodotti	Metronidazolo	

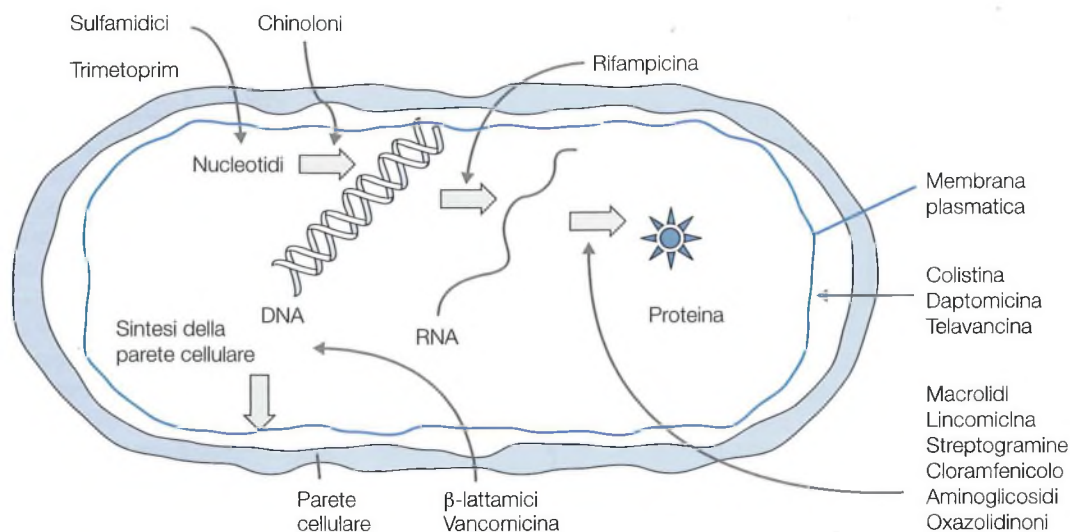


FIGURA 46.1 Gli antibiotici attualmente disponibili possono essere raggruppati sulla base del meccanismo d'azione con il quale interferiscono con i processi biologici dei batteri. In particolare si riconoscono antibiotici attivi sui processi di sintesi della parete cellulare, della replicazione, della trascrizione e della traduzione degli acidi nucleici, sulla funzionalità della membrana citoplasmatica e sul metabolismo cellulare.

si ritiene che i farmaci battericidi possano avere qualche utilità aggiuntiva in caso di pazienti neutropenici o in situazioni di scarsa penetrazione tissutale degli antibiotici come nel caso delle endocarditi.

Meccanismi d'azione dei farmaci antibatterici

Le funzioni batteriche inibite dagli antibiotici attualmente disponibili per l'uso terapeutico possono essere schematicamente suddivise nel seguente modo (Tabella 46.1 e Figura 46.1):

- ▶ sintesi del peptidoglicano della parete cellulare;
- ▶ trascrizione del DNA e traduzione dell'RNA;
- ▶ sintesi e replicazione del DNA;
- ▶ funzioni della membrana citoplasmatica;
- ▶ metabolismo cellulare.

Inibitori della sintesi del peptidoglicano

Le pareti cellulari dei batteri sono essenziali per la loro normale crescita e per il loro sviluppo. Il peptidoglicano è un componente eteropolimerico della parete cellulare rigida che fornisce stabilità meccanica in virtù della sua struttura altamente reticolata. Il peptidoglicano è composto da catene glicaniche, formate da filamenti lineari di due amminozuccheri alternati, N-acetilglucosamina (GlcNAc) e acido N-acetilmuramico (MurNAc), che sono incrociati con catene peptidiche la cui composizione varia a seconda del ceppo batterico (ad esempio, è L-ala + D-glu + m-DAP + D-ala D-ala nell'*Escherichia coli*). L'unità peptidoglicanica è quindi costituita da un eteropolimero GlcNAc-MurNAc a cui sono attaccate (a livello del MurNAc) dei brevi peptidi. La parete si forma quando le catene peptidiche di unità adiacenti si legano fra loro covalentemente a formare strati sovrapposti che possono arrivare a essere un centinaio nei batteri Gram-positivi, mentre sono solo uno o due nei Gram-negativi (Figura

46.2). Durante la divisione e l'allungamento cellulare, il peptidoglicano esistente viene tagliato e del nuovo materiale viene inserito. Questo processo è estremamente delicato e necessita di un bilanciamento dinamico continuo. Quando l'equilibrio viene alterato dall'azione di un antibiotico, la parete cellulare non riesce più a controllare la pressione interna della cellula batterica che, se in ambiente ipotonico, va incontro a rigonfiamento e lisi. La sintesi del peptidoglicano avviene attraverso decine di reazioni enzimatiche che avvengono in compartimenti cellulari distinti (Figura 46.3).

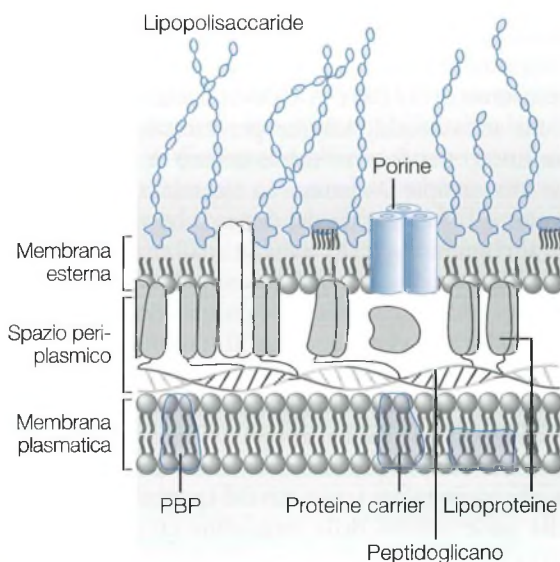


FIGURA 46.2 Rappresentazione schematica della struttura della parete cellulare e della membrana plasmatica dei batteri Gram-negativi. I batteri Gram-positivi non possiedono la membrana esterna e il peptidoglicano è multistrato. PBP: Penicillin Binding Protein.

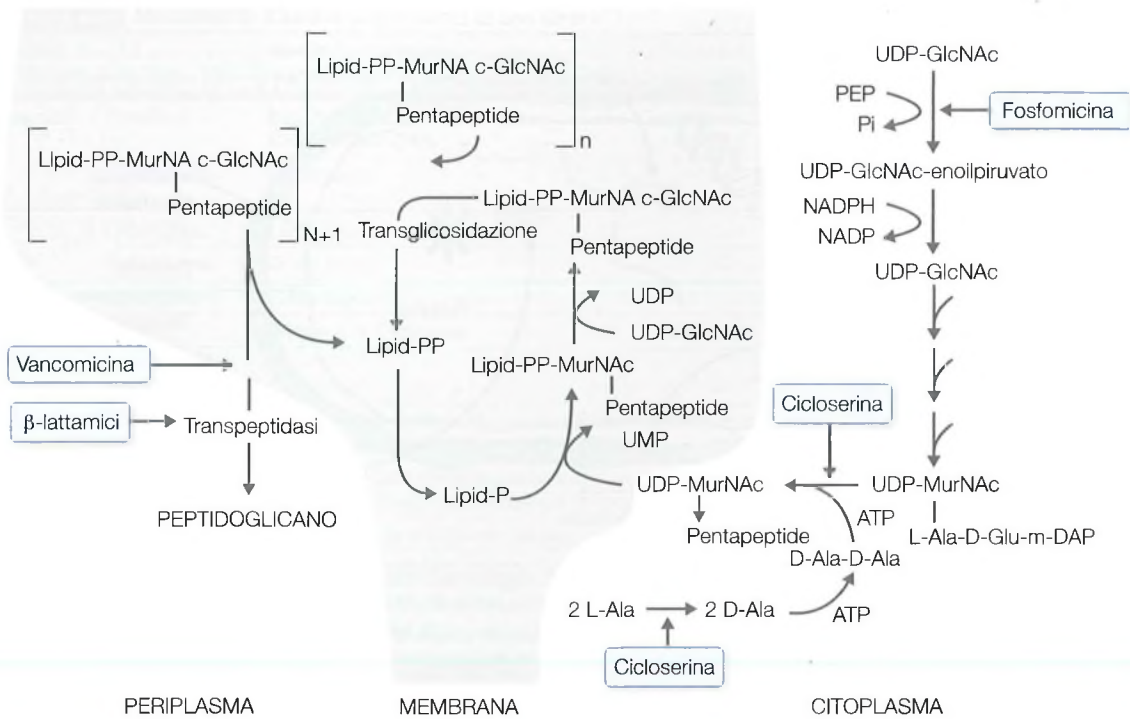


FIGURA 46.3 Schema della biosintesi del peptidoglicano e livelli ai quali agiscono alcuni degli antibiotici che interferiscono con la sintesi della parete batterica. Lo spazio grigio rappresenta la membrana plasmatica (membrana interna nei Gram-negativi).

La fase citoplasmatica del processo di biosintesi del peptidoglicano e i suoi inibitori farmacologici

La prima reazione avviene nel citoplasma e consiste nel trasferimento del fosfoenolpiruvato (PEP) all'uridindifosfato-N-acetil-glucosammina (UDP-GlcNAc), passaggio catalizzato dall'enzima N-acetilglucosammina-3-O-enoilpiruvil transferasi (MurA) che può essere inibito dalla fosfomicina. La successiva riduzione porta a formazione di uridindifosfato-N-acetil-muramico (UDP-MurNAc) e consumo di NADPH. A UDP-MurNAc si aggiungono alcuni amminoacidi (cinque per *Escherichia coli*, dieci non lineari per *Staphylococcus aureus*) di cui gli ultimi due sono sempre D-alanina. La racemizzazione della L-alanina e la formazione del dimero che viene aggiunto agli altri amminoacidi è catalizzata dall'enzima D-alanil-D-alanina sintetasi che può essere inibito dalla cicloserina, un antibiotico analogo strutturale della D-alanina. L'UDP-MurNAc-peptide si lega al trasportatore lipidico bactoprenolo presente a livello della membrana citoplasmatica. Qui all'UDP-MurNAc-peptide viene legato l'altro zucchero GlcNAc e si forma così il disaccaride peptidico (MurNAc-GlcNAc-peptide), monomero del peptidoglicano, che viene infine traslocato dal trasportatore lipidico nella parte esterna della membrana citoplasmatica. Il carrier lipidico (lipid-PP, Figura 46.3) è riutilizzato dalla cellula batterica per trasportare altre unità disaccaridiche.

Fosfomicina

La fosfomicina è un antibiotico ad ampio spettro d'azione con attività battericida ed è l'unico rappresentante

di questa classe presente nell'uso clinico. L'antibiotico è trasportato attivamente all'interno della cellula batterica, attraverso i sistemi di trasporto del 6-esoso fosfato e dell'L-γ-glicerofosfato, e raggiunge concentrazioni intracellulari molto alte. La fosfomicina agisce come analogo del fosfoenolpiruvato legandosi covalentemente e irreversibilmente al sito catalitico dell'enzima MurA che provvede al trasferimento del fosfoenolpiruvato all'N-acetilglucosammina.

Cicloserina

La D-cicloserina agisce come inibitore competitivo di due enzimi posti in serie nel processo di sintesi del peptide D-alanil-D-alanina: la L-alanina racemasi e la D-alanil-D-alanina sintetasi. La D-cicloserina è un analogo strutturale della D-alanina e la sua efficacia è inibita da elevate concentrazioni dell'amminoacido.

Inibitori della polimerizzazione del peptidoglicano

Nella parte extracellulare avvengono le reazioni di transglicosilazione, che consentono l'allungamento del monomero, e di transpeptidazione, che danno origine al polimero di peptidoglicano.

La reazione di transpeptidazione coinvolge invariabilmente la penultima delle due D-alanine e un altro amminoacido di una catena peptidica adiacente (m-DAP nel caso di *Escherichia coli*). La D-alanina terminale viene rilasciata. Questa reazione di transpeptidazione è inibita con meccanismi diversi da antibiotici β-lattamici e da glicopeptidi.

Glicopeptidi

I glicopeptidi, vancomicina e teicoplanina, sono stati scoperti negli anni 50 quali metaboliti secondari di due streptomyceti del suolo. Sono costituiti da un grande nucleo eptapeptidico e vari zuccheri o amminozuccheri. Lo spettro d'azione antimicrobica dei glicopeptidi è limitato alle specie batteriche Gram-positive. Infatti, poiché si tratta di molecole antibiotiche voluminose e polari, non penetrano agevolmente la membrana lipidica esterna dei batteri Gram-negativi e quindi non raggiungono i bersagli specifici sul peptidoglicano.

Il meccanismo d'azione di questi antibiotici consiste nella inibizione della sintesi del polimero mureinico della parete cellulare procariotica tramite la formazione di un complesso molecolare ad alta affinità tra il sito recettoriale glicopeptidico e il dimero destroalaninico terminale del pentapeptide glicanico: di conseguenza viene a essere impedita, per ingombro sterico, la funzione transglicosilasi, mediante la quale i precursori vengono legati al polimero peptidoglicanico nascente della parete cellulare, e analogamente è impedita la funzione transpeptidasi parietale che completa la sintesi della parete batterica (Figura 46.3).

β -lattamici

Le β -lattamine costituiscono la classe più numerosa di antibiotici e sono caratterizzate dalla presenza nella loro molecola di un anello tetratomico azetidionico (nucleo β -lattamico) che ha dato il nome all'intero gruppo e dalla cui integrità dipende l'attività antibatterica: trasformazioni metaboliche o alterazioni chimiche a carico di questa porzione della molecola annullano infatti l'attività biologica.

La classe degli antibiotici β -lattamici (penicilline, cefalosporine e monobattami) ha avuto negli scorsi quaranta anni un eccezionale sviluppo, portando a oltre cento il numero delle molecole che sino a oggi si sono affermate nella pratica medica (Tabella 46.1).

Con l'isolamento del nucleo penamico e del nucleo cefemico è stato possibile incrementare lo sviluppo di questa classe di antibiotici dato che le modificazioni apportate al nucleo stesso e l'aggiunta di catene laterali in varie posizioni hanno permesso di ottenere derivati semisintetici dotati di attività antibatterica e di comportamento farmacocinetico completamente diversi da quelli caratteristici della molecola originale.

I bersagli cellulari degli antibiotici contenenti un nucleo β -lattamico sono le transpeptidasi, enzimi che catalizzano la formazione del legame peptidico tra le catene amminoacidiche di peptidoglicani adiacenti. Questi enzimi, comunemente chiamati *Penicillin Binding Proteins* (PBPs, proteine che legano la penicillina) (Figura 46.2), sono associati alla membrana plasmatica e hanno il sito catalitico rivolto verso l'esterno. Il termine PBPs include anche altre proteine del batterio che sono legate dagli antibiotici β -lattamici ma che non hanno funzione transpeptidasi e che sono coinvolti in molteplici funzioni, quali il mantenimento della forma del batterio e i processi di moltiplicazione (carbossi-peptidasi e endopeptidasi).

Le penicilline, così come gli altri antibiotici β -lattamici, sono analoghi strutturali del dipeptide D-alanil-D-alanina; esse acilano i residui di serina presenti nel sito attivo delle PBPs (con apertura dell'anello β -lattamico a livello del legame ammidico CO-N) formando derivati inattivi (Figura 46.4).

L'inibizione della reazione di transpeptidasi porta all'indebolimento della parete cellulare e quindi alla lisi batterica, probabilmente anche per l'intervento di autolisine (dette anche murein idrolasi) che sono normalmente espresse in occasione dei processi di divisione cellulare. L'azione dei β -lattamici (così come di altri inibitori della parete cellulare), agendo sulla sintesi dei componenti della parete cellulare, dipende fortemente dalla velocità di crescita delle cellule batteriche: cellule in rapida crescita sono uccise più rapidamente rispetto a quelle che si moltiplicano più lentamente. L'effetto batteriolitico è assente in cellule quiescenti. L'inibizione di altre PBPs diverse dalle transpeptidasi è probabilmente responsabile delle ulteriori alterazioni della biologia del batterio, come ad esempio la comparsa di cellule dotate di aspetto filamentoso.

Inibitori della trascrizione

Nei batteri, le reazioni di trascrizione e traduzione sono accoppiate. Benché tali processi avvengano sia in eucarioti che procarioti, le differenze molecolari sono sufficientemente elevate da garantire una spiccata selettività antibatterica per gli antibiotici inclusi in questa sezione. Le differenze a livello molecolare della sintesi proteica tra eucarioti e procarioti sono riportate nella tabella 46.2.

Rifamicine

Le rifamicine, chiamate anche ansamicine, rappresentano una famiglia di antibiotici scoperti in Italia e prodotti dallo *Streptomyces mediterranei*. Si tratta di sostanze costituite da un nucleo cromoforo naftoidrochinonico, con una lunga catena alifatica che riunisce come un ponte due punti del nucleo aromatico. Sono attive sia nei confronti del micobatterio tubercolare che di altri batteri. La rifaximina si distingue dagli altri perché non viene

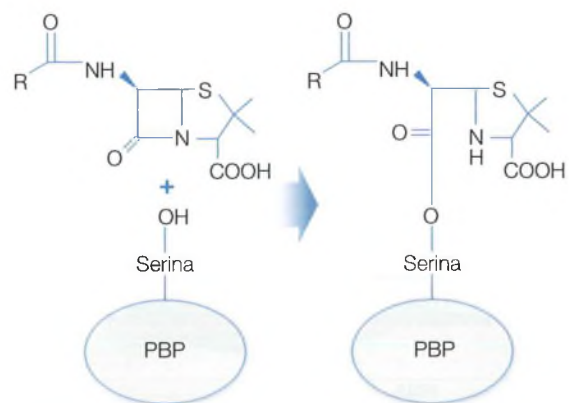


FIGURA 46.4 Inibizione delle PBP (*Penicillin Binding Protein*) mediante acilazione del gruppo OH della serina da parte di un β -lattamico.

TABELLA 46.2 Differenze a livello della sintesi proteica tra cellule eucariote e procariote

	Eucarioti	Procarioti
Dimensioni del ribosoma	80 S	70 S
RNA	5S, 29S, 18S	5S, 23S, 16S
t-RNA (inizia la sintesi proteica)	Met-tRNA	F-met-tRNA
Fattori di iniziazione	eIF1, eIF2, eIF3, eIF4	IF1, IF2, IF3 – diversi dagli eucarioti
Fattori di allungamento	EF-1 α , EF-1 β , EF2	EF-Tu, EF-Ts, EF-G diversi dagli eucarioti
Fattori di terminazione	eRF	RF1, RF2, RF3

assorbita dal tratto gastroenterico e pertanto è usata solo per le infezioni gastrointestinali.

La rifamicina blocca la trascrizione dell'informazione genetica nelle cellule batteriche a livello della RNA-polimerasi, un enzima complesso, ad alto peso molecolare, formato da diverse catene polipeptidiche costituito da 2 subunità uguali: ciascuna subunità è formata da 4 polipeptidi differenti e cioè 2 α , β , β' . È stato dimostrato che il sito specifico di azione è rappresentato dalla subunità β , anche se le rifamicine si legano strettamente soltanto all'oloenzima o a un enzima parzialmente ricostruito, formando un complesso stabile e inibendo l'inizio della trascrizione, bloccando così la reazione del primo nucleotide con l'enzima. Pertanto non interrompono la sintesi dell'RNA quando è già iniziata ma impediscono la formazione di nuove molecole. Il risultato finale è comunque l'inibizione della sintesi proteica. Questo meccanismo di azione è stato dimostrato in varie specie batteriche, ma non sul corrispondente enzima delle cellule animali, anche se una inibizione della sintesi dell'RNA nei mitocondri dei mammiferi è possibile per concentrazioni molto elevate, che comunque non si raggiungono alle dosi abituali.

Le rifamicine possono inoltre inibire l'RNA-polimerasi di alcuni virus a DNA, con concentrazioni relativamente alte di antibiotico (dell'ordine di 100 mg/l), e teoricamente anche la trascrittasi inversa.

Inibitori della traduzione

La traduzione (sintesi proteica) avviene in tre fasi: attivazione del tRNA, allungamento e terminazione della catena peptidica (Figura 46.5). La prima fase prevede l'intervento della subunità ribosomiale 30S, un complesso macromolecolare formato da 21 proteine e una singola molecola 16S di RNA, del tRNA attivato e dell'mRNA. In questa fase intervengono i fattori di inizio IF1, IF2, IF3. Con la partecipazione della subunità ribosomiale 50S si attua il trasferimento del tRNA attivato nel sito P (sito in cui inizia la sintesi del nuovo peptide). La seconda fase, di allungamento, richiede il posizionamento di un nuovo amminoacil-tRNA nel sito A (sito accettore) con l'aiuto dei fattori di allungamento EF-Tu e EF-Ts (EF: *Elongation Factor*). L'enzima peptidiltransferasi nella subunità 50S catalizza il trasferimento del nuovo amminoacido all'ammino gruppo dell'ultimo amminoacido della catena nascente presente nel sito P; il fattore EF-G consente lo slittamento dal ribosoma di un codone, e infine il tRNA libero dall'amminoacido viene rilasciato. Nella terza fase, detta di terminazione, codoni di arresto (stop-codon) attivano l'intervento dei fattori di rilascio RF1, RF2, RF3. Diversi antibiotici inibiscono la traduzione nei batteri legandosi a componenti specifici del ribosoma. La figura 46.6 mostra schematicamente un ribosoma batterico e segnala i siti di interazione e i meccanismi d'azione con cui i diversi antibiotici interferiscono con la funzionalità ribosomiale. Gli effetti batteriostatici e battericidi che possono risultare dall'azione di questi antibiotici sono il risultato finale dell'inibizione e/o dell'alterazione della sintesi proteica da essi indotte.

Tetracicline

Le tetracicline sono antibiotici, batteriostatici, a largo spettro che inibiscono la sintesi proteica batterica legandosi alla subunità ribosomiale 30S e bloccando il legame del tRNA al sito A. Tra i primi antibiotici ad ampio spettro, il loro utilizzo clinico è ora molto diminuito a causa delle resistenze batteriche dovute al grande utilizzo nelle malattie infettive e come additivo dei mangimi per animali da allevamento. Rimangono utili nelle infezioni da rickettsie, clamidie e micoplasmi e in alcune infezioni delle vie respiratorie.

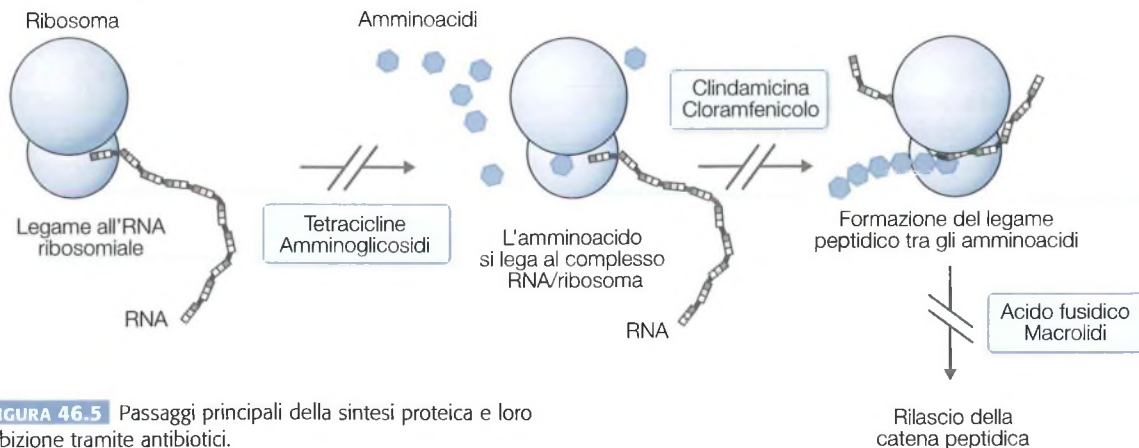


FIGURA 46.5 Passaggi principali della sintesi proteica e loro inibizione tramite antibiotici.

Amminoglicosidi

Il gruppo comprende gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, isepamicina, kanamicina, streptomina, paromomicina e neomicina. Questi farmaci sono utilizzati principalmente per il trattamento di infezioni causate da batteri aerobi Gram-negativi; streptomina è un importante agente per il trattamento della tubercolosi, e paromomicina viene utilizzata per via orale per amebiasi intestinale e nella gestione del coma epatico. A differenza della maggior parte degli inibitori della sintesi delle proteine microbiche, che sono batteriostatici, gli amminoglicosidi sono inibitori di sintesi proteica battericidi. Sono policationi, e la loro polarità è responsabile dello scarso assorbimento per via orale e della scarsa distribuzione nel liquido cerebrospinale. Sebbene gli amminoglicosidi siano ampiamente utilizzati, la tossicità ne limita l'utilità. Tutti i membri del gruppo condividono lo stesso spettro di tossicità, in particolare nefrotossicità e ototossicità.

Questi farmaci contengono amminozuccheri legati a un anello, detto amminociclitol, da legami glicosidici. Lo zucchero può essere una streptidina (nella streptomina) o una 2-deossistreptamina (negli altri amminoglicosidi). Generalmente inclusa tra gli amminoglicosidi in quanto dotata dell'anello amminociclitico è la spectinomina che manca però dell'amminozucchero.

Lo spettro antimicrobico è ampio e comprende stafilococchi, enterobatteriacee e altri bacilli Gram-negativi, compreso lo *Pseudomonas aeruginosa*.

Gli amminoglicosidi inibiscono la sintesi proteica legandosi a un sito complesso in cui partecipano almeno 3 diverse proteine della subunità 30S (nel caso della streptomina) e anche altre proteine della subunità 50S (nel caso degli altri amminoglicosidi). Il risultato del legame è una distorsione del sito A, a cui si lega la formil-metionina (primo formil-amminoacido nella sintesi proteica nei procarioti) (Figura 46.6). L'intero ribosoma rimane bloccato sul codone d'inizio e la sintesi proteica non procede (è il cosiddetto "accumulo di monosomi streptomycinici"). In aggiunta, a bloccare la traduzione e con un'efficacia che varia tra i vari composti (probabilmente a causa di differenze del sito di legame sul ribosoma), gli amminoglicosidi causano anche errori nella lettura (misreading) dell'mRNA e quindi formazione di proteine mutate o troncate.

L'effetto battericida è legato all'entità della penetrazione intracellulare dell'antibiotico sia mediante canali porinici nello spazio periplasmico dei batteri Gram-negativi che con l'attraversamento della membrana interna o citoplasmatica per trasporto attivo, ossigeno-dipendente.

Nella diffusione all'interno del batterio, si distinguono due fasi: la fase energia-dipendente I (EDP1), e la fase energia-dipendente II (EDP2). Dopo la fase EDP1, che può essere bloccata o comunque inibita dai cationi bivalenti (Ca^{2+} , Mg^{2+}), dall'anaerobiosi, dall'iperosmolarità o dalla riduzione del pH, l'amminoglicoside si lega irreversibilmente al ribosoma con conseguente inibizione della sintesi proteica ed eventuale produzione di proteine aberranti che, una volta inserite nella membrana bat-

terica, potrebbero provocarne un'alterata permeabilità con ulteriore stimolazione del trasporto di farmaco (fase EDP2), con successiva rottura della membrana stessa.

Macrolidi, lincosamina, streptogramina e cloramfenicolo

Nonostante le differenze nella loro struttura chimica, macrolidi, lincosamina, streptogramina e cloramfenicolo vengono descritti insieme in quanto esplicano il medesimo meccanismo d'azione sulla subunità 50S dei ribosomi batterici. Sono tutti antibiotici ad azione batteriostatica nei confronti della maggior parte delle specie batteriche sensibili. Macrolidi, lincosamine e streptogramine competono per lo stesso sito di legame a livello ribosomale che sembra essere situato in vicinanza del sito P della peptidil-transferasi, che coinvolge sia l'rRNA23S che alcune proteine (Figure 46.5 e 46.6). Infatti in vitro tutte queste molecole inibiscono la reazione di peptidiltransferasi. Inoltre, i batteri contenenti ribosomi con il residuo di adenina 2058 dell'rRNA 23S dimetilata sono resistenti a macrolidi, lincosamina e streptogramina (questo tipo di resistenza è chiamata MLS), ma non al cloramfenicolo. Il meccanismo con cui questi diversi antibiotici inibiscono la sintesi proteica è leggermente diverso. Nel caso del cloramfenicolo il passaggio inibito sembra essere lo spostamento della coda del tRNA con l'amminoacido attaccato al sito accettore della subunità 50S. In questo modo la peptidiltransferasi, che dovrebbe legare il nuovo amminoacido alla catena polipeptidica, è priva del suo substrato e la crescita della catena si ferma. Per gli altri, il passaggio inibito sarebbe lo spostamento della catena nascente dal sito A a quello P. Dal punto di vista funzionale, anche in questo caso si realizza un'inibizione dell'attività peptidiltransferasica.

Ossazolidinoni

Questi farmaci rappresentano una nuova classe di inibitori della sintesi proteica scoperti mediante screening random su una vasta collezione di composti di sintesi chimica. Sono antibiotici batteriostatici e agiscono sui batteri Gram-positivi con il vantaggio di poter essere utilizzati come farmaci sia parenterali che orali.

Il linezolid è la prima molecola di questa classe a essere

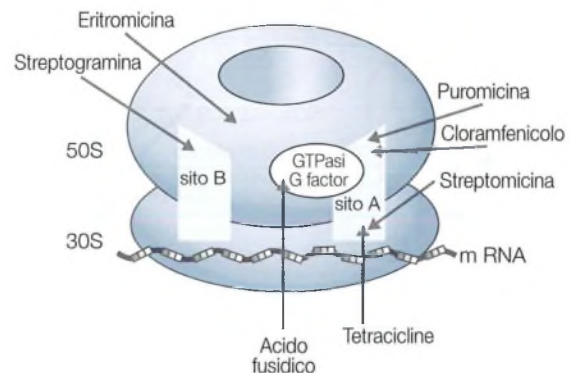


FIGURA 46.6 Il ribosoma batterico e siti di legame di farmaci antibatterici. Sito A: sito accettore; sito B: sito donatore.

entrata nell'uso clinico come antibatterico utile nelle gravi infezioni nosocomiali da Gram-positivi (stafilococchi, *Streptococcus pneumoniae* ed enterococchi) resistenti anche ai glicopeptidi.

La caratteristica strutturale è rappresentata dal gruppo N-ariloxazolidinone, da cui il nome della classe. A tale gruppo, essenziale per l'attività del farmaco, sono legati un gruppo acil-ammino-metilico; e un gruppo morfolinico in posizione para.

Il meccanismo d'azione degli oxazolidinoni è unico nel suo genere: essi bloccano la sintesi proteica in una fase molto precoce, inibendo la formazione del complesso d'inizio, attraverso il legame reversibile con l'rRNA 23S della subunità ribosomiale 50S; tale legame in qualche modo altera il sito P deputato al legame del peptidil-tRNA sulla subunità 50S e ciò contrasterà l'adattamento dell'fMet-tRNA al sito e l'ancoraggio delle due subunità durante la formazione del complesso d'inizio (Figura 46.7), impedendo di fatto la traduzione dell'mRNA. In particolare essi si legano al ribosoma con il sito P già impegnato, ma, senza apparentemente interagire con la parte peptidica, si posizionano nello spazio normalmente occupato dal residuo amminoacilico dell'amminoacil-tRNA legato al sito A; in questo modo viene impedito il

legame o il posizionamento corretto dell'amminoacil-tRNA nel sito attivo della peptidil-transferasi.

Il blocco della sintesi proteica in una fase così precoce porta a prevenire la sintesi di vari fattori di virulenza, come coagulasi, emolisine, proteina A, di stafilococchi e streptococchi, e a non essere suscettibile di resistenza crociata con altri antibatterici, come cloramfenicolo, macrolidi, lincosamidi, streptogramine e tetracicline che agiscono pure sulla sintesi proteica, ma in una fase più tardiva impedendo l'allungamento della catena peptidica. Di recente, tuttavia, è stata rilevata la possibilità di una resistenza crociata con cloramfenicolo e quinopristin-dalfopristin.

Acido fusidico

Interferisce a livello della sintesi proteica nel processo di allungamento, in particolare con il fattore di allungamento EF-G, stabilizzando il complesso ternario ribosomi-EFG-GDP e inibendo la translocazione dal ribosoma. L'acido fusidico è uno dei pochi inibitori della sintesi proteica ad azione battericida. È attivo su alcuni gram-positivi, ma il suo impiego principale è nei confronti dello *S. Staphylococcus aureus*.

Mupirocina

Mupirocina è un antibiotico a uso topico (se somministrato per altre vie è completamente metabolizzato e trasformato in prodotti inattivi) che inibisce la formazione dell'amminoacil-tRNA; in particolare viene inibito in modo competitivo l'enzima isoleucil tRNA sintetasi. Mupirocina è attivo solo su batteri Gram-positivi in quanto incapace di attraversare la membrana esterna della parete cellulare dei Gram-negativi.

Inibitori della sintesi e della replicazione del DNA

La replicazione del DNA si attua attraverso una serie di reazioni enzimatiche che vanno dalla sintesi dei precursori nucleotidici alla polimerizzazione della catena dell'acido nucleico.

Chinoloni

I chinoloni sintetizzati dal 1962 al 1974, (prima generazione) quali ad esempio l'acido nalidixico, furono impiegati soprattutto come antisettici urinari. Hanno invece assunto prevalentemente ruolo di farmaci sistemici i chinoloni della seconda generazione (ciprofloxacina, ofloxacina, pefloxacina), dotati di un più ampio spettro d'azione, comprendente le specie batteriche aerobiche Gram-negative (comprese le *Pseudomonadaceae*) e i cocci Gram-positivi, e caratterizzati inoltre da ottima biodisponibilità ed elevata diffusione nel compartimento extravascolare. Alla terza generazione (levofloxacina e moxifloxacina) appartengono molecole metabolicamente più stabili dei composti di seconda generazione, caratterizzate da una estesa attività antimicrobica, comprendente anche gli streptococchi, *Haemophilus influenzae* e *Legionella pneumophila*, e in alcuni casi specie anaerobiche. A livello molecolare i chinoloni agiscono con un meccanismo complesso e non ancora del tutto chiarito. L'azione principale di questi antibiotici si esplica comunque sulla

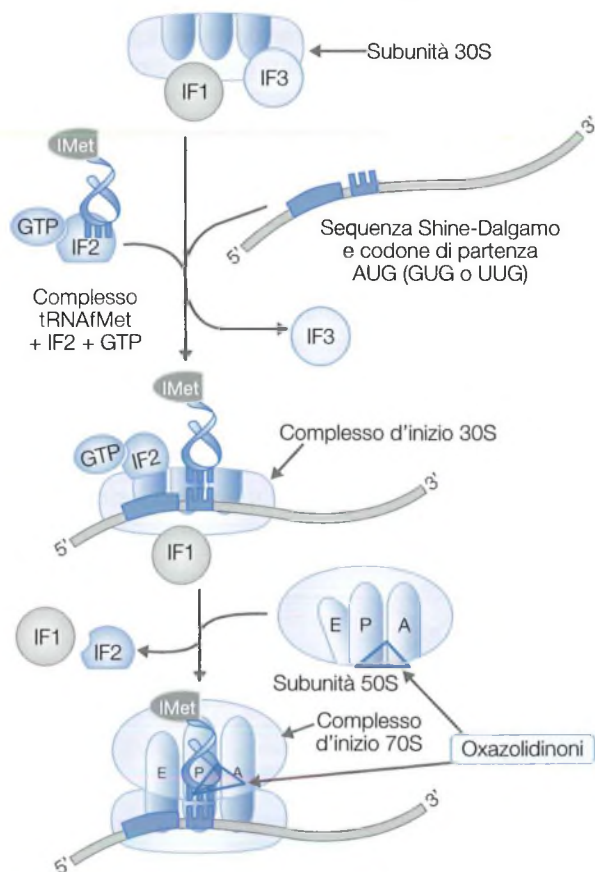


FIGURA 46.7 Meccanismo d'azione degli oxazolidinoni: la molecola si lega alla subunità 50S del ribosoma procariontico impedendo il suo assemblaggio al complesso 30S. In questo modo non si formerà un complesso d'inizio 70S funzionale e la sintesi rimarrà bloccata.

DNA-girasi batterica, o topoisomerasi II, (subunità A) e sulla topoisomerasi IV, enzimi importanti in funzioni cellulari quali replicazione e riparazione del DNA, ricombinazione e trascrizione di alcuni operoni, ma soprattutto indispensabili nel mantenimento della forma superavvolta del DNA batterico.

Il DNA superavvolto dispone di una energia libera maggiore di quella propria del DNA disteso, e questa attivazione energetica condiziona la duplicazione e la trascrizione del cromosoma, favorendo così la riproduzione cellulare e la stessa sopravvivenza del batterio. La DNA-girasi è un enzima composto da due subunità proteiche, A e B, di 97 e 90 kDa rispettivamente; l'enzima attivo è un complesso tetramerico costituito da due subunità A e due B. L'energia necessaria per realizzare il superavvolgimento è resa disponibile dall'idrolisi dell'ATP, processo nel quale è coinvolta la subunità B della girasi, mentre la subunità A è responsabile degli altri processi che portano al superavvolgimento, tranne l'interruzione del DNA che è operata dalla topoisomerasi IV, un enzima omologo della girasi con elevato potere decatenante.

Il bersaglio primario dell'azione dei fluorochinoloni è rappresentato proprio dalla DNA-girasi, che viene inibita a concentrazioni minori rispetto alla topoisomerasi IV. L'inibizione della girasi risulta inoltre più letale per la cellula batterica, probabilmente perché comporta una riparazione meno efficiente del danno prodotto sul DNA rispetto a quello indotto dal blocco dell'altro sistema enzimatico. Tuttavia non è ancora chiarito se tale modello sia applicabile per tutti i batteri e in particolare anche per le specie Gram-positive. Inoltre vi sono differenze tra i vari chinoloni in termini di affinità e attività intrinseca nei confronti dei due enzimi. Si potrebbe addirittura ipotizzare che, in una determinata specie batterica, il bersaglio primario possa essere diverso in funzione delle differenze strutturali tra le varie molecole, contribuendo così a una modulazione dello spettro di attività.

Sulfonamidì e trimetoprim

Le sulfonamidì, derivati del p-benzensulfonamide, sono stati i primi chemioterapici efficaci usati sull'uomo per le infezioni batteriche di tipo sistemico. Questi farmaci batteriostatici sono analoghi strutturali e inibitori competitivi dell'acido p-amminobenzoico (PABA), intermedio fondamentale della sintesi dell'acido folico. Il bersaglio enzimatico delle sulfonamidì è la diidropteroato sintetasi (DHPS). In seguito all'inibizione dell'enzima, viene bloccata la sintesi di acido folico, essenziale per la cellula batterica (Figura 46.8).

Trimetoprim (Tp), così come le sulfonamidì, è un farmaco di sintesi che inibisce l'enzima deidrofollato reductasi (DHFR) che catalizza la reazione enzimatica successiva alla diidropteroato sintetasi (bersaglio delle sulfonamidì). Il trimetoprim è batteriostatico se usato da solo mentre è battericida in combinazione con le sulfonamidì. Trimetoprim e sulfonamidì non agiscono sulle cellule eucariote in quanto il bersaglio della sulfonamide non è presente negli eucarioti, mentre l'enzima DHFR è sufficientemente diverso da quello dei procarioti.

Inibitori delle funzioni della membrana citoplasmatica

La membrana citoplasmatica dei batteri ha una composizione diversa da quella di altre cellule; non sono presenti infatti né i lipidi tipici dei funghi, come gli steroli, né i lipidi presenti nelle cellule eucariote, ricche di colesterolo. Questa caratteristica è sfruttata da alcuni composti in grado di legare specifici fosfolipidi di membrana. A differenza di quanto avviene per gli altri antibiotici, la selettività nei confronti dei procarioti è molto scarsa, la tossicità elevata e l'uso limitato alle applicazioni locali.

Polimixine

Le polimixine comprendono diversi antibiotici tra i quali i più noti sono le polimixine B e la colistina (colimicina). La polimixina B è costituita da un anello eptapeptidico con una catena lipofila che penetra per diffusione passiva nella membrana cellulare e ne disorganizza la struttura interagendo con i fosfolipidi. La sensibilità del batterio è dipendente dal contenuto di fosfolipidi della membrana stessa. La disorganizzazione dello strato lipidico provoca la formazione di pori artificiali attraverso cui ioni, nucleotidi e altre piccole molecole fuoriescono dal batterio. La polimixina B si lega e inattiva la endotossina della membrana esterna dei batteri Gram-negativi riducendone anche così la patogenicità. La colistina, particolarmente attiva su *Pseudomonas aeruginosa*, un tempo scarsamente impiegata in clinica, è ritornata all'impiego soprattutto per l'emergenza di resistenza batterica. Non è inusuale oggi trovare *Pseudomonas* sensibili solo alla colistina.

Daptomicina

La daptomicina è un prodotto lipopeptidico ciclico naturale, attivo solo contro i batteri Gram-positivi. Il farmaco non viene assorbito dal tratto gastro-intestinale e pertanto viene impiegato solo per via endovenosa.

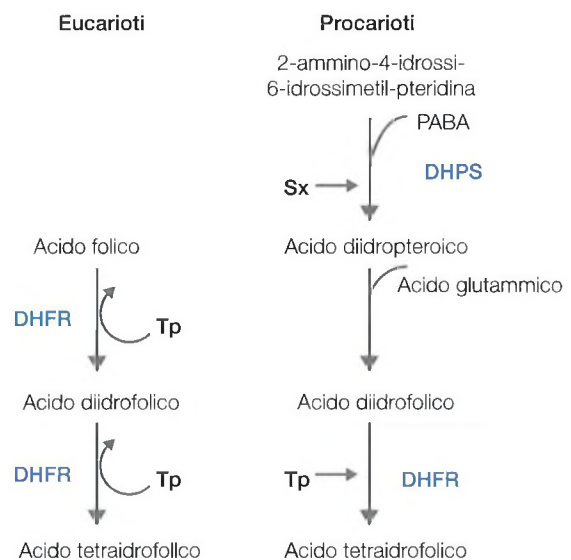


FIGURA 46.8 Schema della biosintesi dell'acido tetraidrofolico negli eucarioti e nei procarioti e bersagli di sulfonamidì (Sx) e trimetoprim (Tp).

Il meccanismo d'azione è dato dalla capacità della daptomicina di legarsi (in presenza di ioni di calcio) alle membrane batteriche delle cellule nella fase sia proliferativa che stazionaria, favorendo la fuoriuscita di ioni K^+ inducendo la depolarizzazione e la rapida inibizione della sintesi delle proteine, del DNA e dell'RNA. Questa azione porta alla morte cellulare dei batteri con lisi della parete cellulare trascurabile, il farmaco viene legato dal surfactante alveolo-polmonare che ne inattiva l'azione. Pertanto non può essere impiegato nelle infezioni brocopolmanari.

Telavancina

È un nuovo antibiotico lipoglicopeptide che possiede una rapida attività battericida contro un ampio spettro di patogeni Gram-positivi. È un derivato semisintetico della vancomicina caratterizzato da una catena laterale idrofobica (decilamminoetilica) legata alla vancosamina e da un gruppo idrofilo fosfonometil amminico legato a un amminoacido della catena peptidica.

Questo antibiotico ha un duplice meccanismo d'azione inibendo la sintesi del peptidoglicano e inoltre causa depolarizzazione della membrana.

Come la vancomicina, telavancina inibisce la biosintesi del peptidoglicano in modo substrato-dipendente; inoltre, tramite la catena laterale lipofila, aumenta la permeabilità di membrana con perdita di ATP cellulare e K con meccanismo simile a quello della daptomicina. Telavancin è costantemente attiva contro lo *Staphylococcus aureus*, compresi ceppi meticillino-resistenti, vancomicina-intermedi e linezolid resistenti.

Meccanismi di resistenza ai farmaci antibatterici

I farmaci antimicrobici, quando introdotti nella pratica clinica, sono stati vissuti come cure quasi miracolose. Tuttavia, dopo la scoperta della penicillina è diventato subito evidente che la resistenza può svilupparsi rapi-

damente con il rischio di rendere inutili questi farmaci. Questo fenomeno, da considerare in modo molto serio, è sempre presente in ogni nuovo agente antimicrobico e minaccia la fine dell'era antimicrobica. Oggi, ogni principale classe di antibiotici è associata con la comparsa di resistenza. Due fattori principali sono alla base della comparsa di resistenza agli antibiotici: evoluzione dei microrganismi e pratiche cliniche/ambientali. Una specie batterica sottoposta a pressione, chimica o altro, che minaccia la sua estinzione si evolve spesso acquisendo meccanismi che le consentono di sopravvivere a tali eventi. Questa evoluzione è in gran parte facilitata dall'uso terapeutico non adeguato e dall'uso indiscriminato degli antibiotici a scopo agricolo e zootecnico. Nella figura 46.9 vengono schematizzati i principali meccanismi di resistenza.

I batteri possono sviluppare resistenze o mediante mutazione dei propri geni o mediante acquisizione di un gene da un altro batterio che codifica per quella resistenza. Quando una nuova mutazione responsabile della resistenza a un antibiotico è avvenuta in un batterio, questa può diffondersi ad altri microrganismi in vari modi a seconda che la resistenza sia codificata a livello cromosomiale o extracromosomiale. Nel caso in cui la resistenza sia di tipo cromosomiale, il trasferimento da cellula a cellula può avvenire mediante:

- ▶ trasduzione, processo nel quale fagi batterici possono trasferire frammenti di DNA che codificano per la resistenza all'antibiotico;
- ▶ coniugazione tra due batteri in cui si ha il trasferimento del materiale genetico attraverso un ponte citoplasmatico.

Per le resistenze codificate a livello extracromosomiale, i trasportatori possono essere plasmidi, fattori-R, trasposoni ("jumping genes"). Questi frammenti di DNA possono recare più geni causa di contemporanee resistenze a più antibiotici, appartenenti a diverse classi (Figura 46.9).

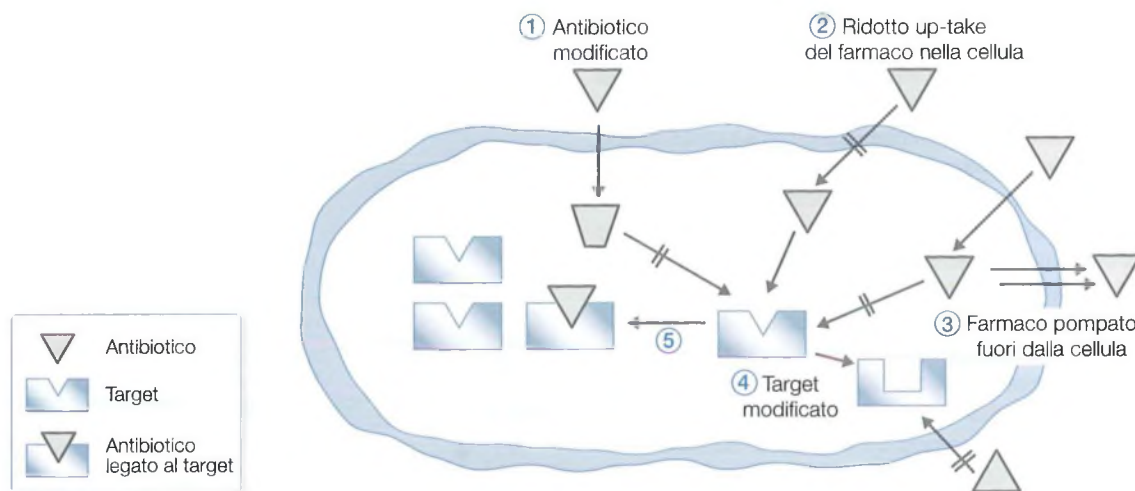


FIGURA 46.9 Principali meccanismi di resistenza. La cellula può: 1) inattivare l'antibiotico alterandone la struttura chimica; 2) ridurre l'incorporazione modificando le proprietà della parete e/o della membrana; 3) aumentarne l'estruzione; 4) modificare il bersaglio dell'antibiotico per mutazione o modificazione post-traduzionale; 5) aumentare l'espressione del bersaglio inibito dall'antibiotico.

In tutti i meccanismi sopra citati, i geni che codificano per la resistenza specifica, quando all'interno del citoplasma, possono essere integrati nel cromosoma batterico o esistere nella cellula come DNA plasmidico. Poiché i plasmidi si replicano in modo indipendente, senza cioè la necessità di integrarsi nel cromosoma batterico, le resistenze codificate a livello plasmidico sono quelle che si diffondono più rapidamente all'interno della popolazione batterica, rispetto a quelle cromosomiche.

Per un'analisi più dettagliata dei meccanismi con i quali si sviluppa e si instaura la resistenza ai farmaci antibatterici vedi **CD**: Approfondimento 46.1. *Meccanismi di resistenza ai farmaci antibatterici.*

Farmaci antifungini

L'aumento dell'incidenza di infezioni fungine sia sistemiche che dermiche negli ultimi decenni ha assunto dimensioni di rilevanza sempre maggiore; tale fenomeno è legato a diversi fattori tra i quali il maggiore impiego di farmaci citotossici (che provocano alterazioni delle difese immunitarie) e l'aumento nella popolazione di soggetti immunocompromessi per infezioni virali (HIV) o perché sottoposti a trattamenti immunosoppressori.

Il trattamento delle infezioni fungine sistemiche fino agli anni 80 era essenzialmente basato sull'uso di amfotericina B. Solo negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi farmaci grazie a investimenti in nuove tecnologie che hanno consentito di:

- identificare e caratterizzare nuovi bersagli selettivi;
- valutare più rapidamente ed economicamente composti sia di origine naturale che di sintesi;
- disegnare molecole "in silico" in grado di inibire bersagli molecolari o processi biochimici essenziali per la vitalità della cellula fungina.

Le infezioni fungine di tipo sistemico a differenza di quelle dermiche sono più problematiche da curare con

i farmaci e per alcune di esse non esiste una terapia efficace.

Tra i farmaci antifungini attualmente disponibili possono essere distinte quattro classi principali: le allilammine, gli azoli, i polieni e le echinocandine. Un ulteriore gruppo comprende flucitosina, griseofulvina e le morfoline. Anche se a un livello inferiore rispetto a quanto accade per i farmaci antibatterici, anche per i farmaci antifungini il fenomeno della resistenza incomincia ad assumere una rilevanza preoccupante, soprattutto per azoli e flucitosina.

Meccanismi d'azione dei farmaci antifungini

Nella figura 46.10 vengono mostrati i possibili livelli d'intervento dei farmaci antifungini.

Farmaci attivi a livello della parete cellulare

La funzione predominante della parete cellulare è quella di controllare la pressione interna di turgore delle cellule; pertanto composti che agiscono su questa struttura portano alla lisi e quindi alla morte cellulare. I componenti macromolecolari della parete che prevalgono nella maggior parte delle specie fungine sono la chitina e i β - o gli α -glucani che sono presenti principalmente nelle strato più interno e dai quali dipendono la forma e la resistenza della parete. Nella parte esterna della parete cellulare sono presenti derivati delle mannoproteine che regolano la porosità, l'adesività e le caratteristiche antigeniche della cellula. I principali farmaci antifungini che alterano la parete cellulare sono le echinocandine, le pramicidine, la nikkomicina.

Echinocandine È una famiglia di antibiotici esapeptidici ciclici dei quali sono presenti all'uso clinico caspofungina, anidulafungina e micafungina. Le echinocandine sono dotate di elevata attività sia sulla *Candida albicans* che su quella *non albicans* dove mostrano attività fungicida. Mostrano anche una buona attività sull'*Aspergillus* dove

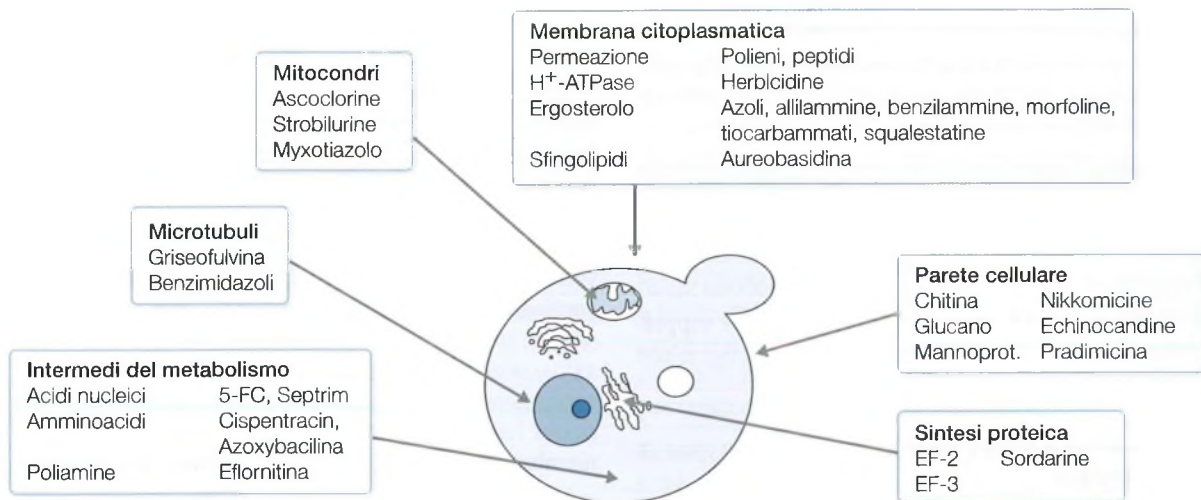


FIGURA 46.10 Meccanismi d'azione dei principali farmaci antifungini.

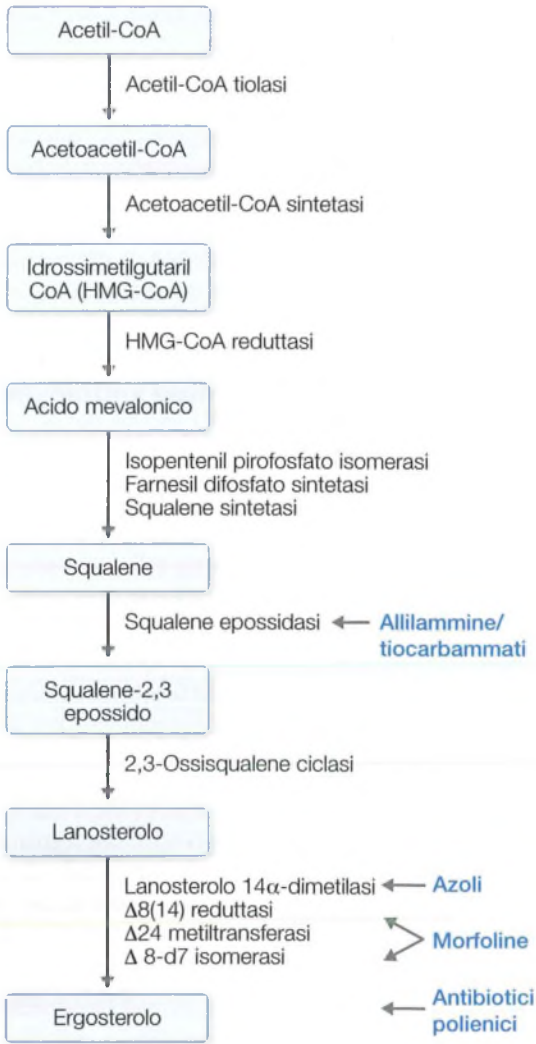


FIGURA 46.11 Fasi della biosintesi dell'ergosterolo e bersagli molecolari di farmaci antifungini usati in ambito clinico.

mostrano attività fungistatica. Il meccanismo d'azione è caratterizzato dall'inibizione dell'enzima $\beta(1,3)$ -D-glucano sintetasi. La ridotta incorporazione di glucano nella parete fungina determina instabilità e ridotta resistenza alla pressione osmotica cui consegue lisi cellulare.

Pramicidine Sono derivati chinonici che agiscono sulla parete cellulare complessando le mannoproteine.

Nikkomicina È un inibitore competitivo della chitina sintetasi.

Gli ultimi due sono ancora in fase preclinica e rappresentano nuove basi per lo sviluppo di antifungini con bersaglio diverso da quelli in uso.

Farmaci attivi a livello della membrana citoplasmatica

La composizione chimica della membrana citoplasmatica dei funghi si differenzia da quella dei batteri e delle cellule eucariote per i tipi di lipidi che la formano, rap-

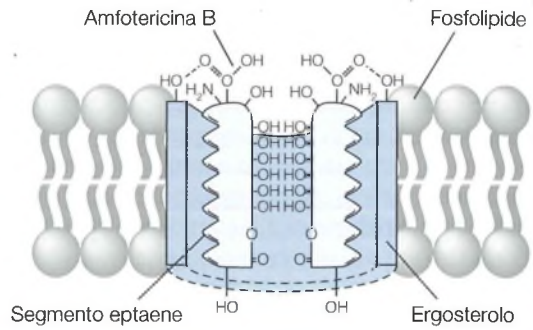


FIGURA 46.12 Meccanismo d'azione dell'amfotericina B. La molecola si intercala nella membrana determinando la formazione di pori che provocano la perdita della permeabilità.

presentati da fosfolipidi e principalmente da steroli (il maggior componente è l'ergosterolo).

Allilammine, tiocarbammati, azoli, morfoline e antibiotici polienici interferiscono con la sintesi dell'ergosterolo

Allilammine e tiocarbammati Solo due allilammine, naftinide e terbinafide, e un tiocarbammati (tolfanate) hanno un impiego clinico (sia topico che sistemico) nel trattamento di dermatomicosi e di forme di candidiasi. Le allilammine e i tiocarbammati sono inibitori reversibili non competitivi della squalene 2,3-epossidasi, l'enzima che insieme alla 2,3-ossidossqualene ciclasi è responsabile della ciclizzazione dello squalene a lanosterolo (Figura 46.11). Gli effetti citotossici sono legati all'accumulo di squalene e alla riduzione della concentrazione di ergosterolo nella membrana, con conseguenti danni funzionali soprattutto a livello di processi di scambio e di accumulo di nutrienti.

Azoli Sono farmaci di sintesi suddivisi in due classi: imidazoli e triazoli. Gli azoli sono principalmente utilizzati per il trattamento topico di dermatofiti e superficiale di candidiasi; solo alcuni di essi sono somministrati per via sistemica. Essi danneggiano la membrana citoplasmatica inibendo l'enzima 14- α -demetilasi, un enzima microsomiale citocromo P450-dipendente, che interviene nella biosintesi dell'ergosterolo, principale componente sterideo presente nella membrana citoplasmatica dei funghi. Le conseguenze di tale inibizione sono la diminuzione dell'ergosterolo e l'accumulo di 14- α -steroli metilati responsabili di alterazioni funzionali di una serie di sistemi enzimatici associati alla membrana, come ad esempio i sistemi di trasporto degli elettroni. Ad alte concentrazioni, generalmente raggiunte con l'uso topico, alcuni azoli (come ad esempio il clotrimazolo), possono svolgere azione fungicida provocando danni diretti a livello della membrana cellulare (aumentata permeabilità cellulare).

Morfoline A eccezione della amorolfina, le morfoline sono derivati sintetici della fenilmorfolina che interferiscono con la sintesi dell'ergosterolo inibendo la δ -8(14)

reduttasi e la δ -24 metiltransferasi, enzimi coinvolti nella conversione del lanosterolo in ergosterolo. In seguito all'inibizione di tali enzimi si ha un accumulo di 24-metilene-ignosterolo nella membrana citoplasmatica, con profonde alterazioni delle proprietà fisiologiche. Il loro impiego è solo topico.

Polieni Sono stati descritti oltre 100 polieni, ma solo poche molecole, tra cui l'amfotericina B e la nistatina, sono utilizzate nell'uomo. L'amfotericina B, dotata di spettro amplissimo che include candida, aspergillo ma anche zigomiceti e fusarium, è stato il primo antimicotico sistemico utilizzato per le micosi invasive e ancora oggi trova largo impiego (Figura 46.12). I polieni sono macrolidi ciclici amfifilici, caratterizzati da doppi legami coniugati all'interno di un estere ciclico. La loro attività antifungina dipende, almeno in parte, dalla formazione di legami stabili con l'ergosterolo e altri steroli presenti nella membrana. A basse concentrazioni ciò porta alla formazione di pori o canali attraverso cui fuoriescono molecole di basso peso molecolare (glucosio, amminoacidi, ioni). A dosi più elevate le dimensioni dei pori sono maggiori e anche proteine citosoliche possono essere perse.

Inibitori della sintesi del DNA e delle proteine

Il derivato pirimidinico 5-fluorocitosina (5-FC) è trasportato all'interno della cellula da una citosina permeasi. Qui viene deaminata a 5-fluorouracile (5-FU), un potente antimetabolita (per maggiori dettagli sul meccanismo d'azione del 5-FU, vedi Capitolo 28). La selettività d'azione nei confronti della cellula fungina risiede nel fatto che le cellule dei mammiferi non sono in grado di convertire la 5-fluorocitosina a 5-FU.

Sordarine Sono antibiotici di origine naturale, in sviluppo clinico, che agiscono in modo altamente selettivo a livello della sintesi proteica interferendo sulla funzionalità del fattore di allungamento EF-2.

Inibitori di enzimi di vie metaboliche

Analoghi di amminoacidi Diversi analoghi di amminoacidi naturali hanno mostrato un'attività antifungina. RI-331 è un inibitore selettivo dell'omoserina deidrogenasi, enzima coinvolto nella biosintesi di metionina, isoleucina e treonina. Lazoxibacillina e il suo estere derivato hanno un'attività antifungina ad ampio spettro e inibiscono la biosintesi degli amminoacidi contenenti zolfo in quanto interferiscono a livello della regolazione dell'espressione e dell'attività enzimatica della sulfite reductasi.

Poliammine Difluorometilornitina, difluorometilarginina e monofluorometildiidronitina sono inibitori suicidi (in quanto si legano in modo irreversibile) dell'ornitina carbossilasi, enzima coinvolto nella sintesi delle poliammine.

Inibitori della mitosi

Griseofulvina Questo composto ha un'azione simile a quella della colchicina e degli alcaloidi della vinca in quanto si lega ai microtubuli. Tuttavia il sito di legame

alla tubulina è diverso da quello dei precedenti e inoltre lega anche alcune MAP (*Microtubule Associated Proteins*). La selettività nei confronti delle cellule fungine è fondamentalmente legata a differenze di affinità nel legame che anche a dosi elevate è scarsa per le cellule dei mammiferi. L'azione della griseofulvina si manifesta a livello morfologico con la produzione di cellule multinucleate, conseguenza del blocco del fuso mitotico.

Meccanismi di resistenza ai farmaci antifungini

Il fenomeno della resistenza ai farmaci antifungini sta assumendo una rilevanza clinica sempre maggiore anche in considerazione dell'aumento dei pazienti immunocompromessi (per cause patologiche o perché immunodepressi farmacologicamente). Vengono di seguito descritti i meccanismi più frequenti di resistenza per ciascuno dei farmaci.

Amfotericina B Nonostante il farmaco sia impiegato da ormai più di 60 anni, la resistenza è ancora scarsa, probabilmente per il meccanismo d'azione abbastanza aspecifico. I meccanismi evidenziati soprattutto in aspergillo sono legati alla sostituzione dell'ergosterolo di membrana con altri precursori sterolici.

Azoli Resistenza a questa classe di farmaci si è sviluppata in diversi funghi con strategie differenti. Il meccanismo principale di resistenza agli azoli, osservabile soprattutto in *Candida albicans*, è la presenza di mutazioni in *ERG11*, il gene che codifica per la 14- α -sterol demetilasi. La mutazione impedisce agli azoli di legarsi al loro sito di attacco sull'enzima. Le mutazioni di solito conferiscono resistenza a tutti i farmaci della classe. Iper-espressione dei trasportatori di membrana ABC e MFS determinano un maggiore efflusso di farmaco dalla cellula fungina con acquisizione di resistenza. Questo meccanismo è stato ben evidenziato in *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Altri meccanismi meno frequenti sono l'aumento di produzione 14- α -sterol demetilasi e mutazioni in *ERG3*, il gene che codifica per la sterol-reduttasi.

Flucitosina La resistenza a questo farmaco si sviluppa in circa il 30% dei pazienti affetti da criptococcosi e trattati esclusivamente con flucitosina. Questa elevata incidenza di resistenza è uno dei motivi che limita l'uso del farmaco in terapia. L'insorgenza della resistenza può essere legata a mutazioni in uno qualsiasi degli enzimi coinvolti nella conversione della flucitosina e nella sua integrazione nell'RNA, ma più di frequentemente occorre a livello dell'uracilfosforibotransferasi. Sono stati isolati ceppi resistenti di *Candida glabrata* (ma non di *Candida albicans*) che presentano mutazioni a livello della citosina permeasi e della citosina deaminasi.

Echinocandine La resistenza a questa classe di antimicotici è ancora rara e si può manifestare per trattamenti particolarmente prolungati. Il meccanismo messo in evidenza è la mutazione in *FKSI*, il gene che codifica per proteine essenziali nel complesso 1,3- β -D-glucano sintetasi.

Farmaci antivirali

I virus sono parassiti cellulari obbligati che per il loro ciclo replicativo richiedono la partecipazione attiva della cellula di cui usano la macchina biosintetica. Non stupisce quindi che i farmaci dotati di attività antivirale possano essere poco selettivi e danneggiare allo stesso tempo virus e cellula ospite. Esistono molti composti che dimostrano un'adeguata attività in vitro ma che risultano poi inutilizzabili in vivo per l'elevata tossicità, spesso dovuta anche alla difficoltà di raggiungere adeguate concentrazioni nell'organo bersaglio. Un altro limite degli farmaci antivirali attualmente disponibili è che essi sono efficaci solo su virus in attiva replicazione all'interno della cellula ospite (non sono quindi in grado di eliminare virus latenti o non in replicazione). Da non dimenticare, inoltre, è il fatto che la completa eradicazione dell'infezione virale richiede anche un'attiva partecipazione da parte del sistema immunitario dell'ospite.

Negli ultimi anni sono stati compiuti enormi progressi nello sviluppo di nuovi farmaci ad attività antivirale, soprattutto contro il virus che causa l'AIDS, ma anche contro i virus che causano epatiti. Tuttavia la ricerca sui farmaci antivirali presenta numerosi problemi di fondo in quanto mancano modelli sperimentali sia su animali che in vitro su cellule isolate che siano in grado di riprodurre fedelmente e riproducibilmente quanto avviene nell'uomo, e le infezioni virali sono in genere tessuto-specifiche e ciò che può valere per inibire un'infezione virale in tessuti epiteliali spesso è del tutto inefficace su altri tessuti o ceppi cellulari.

Meccanismi d'azione dei farmaci antivirali

Nella figura 46.13 e nella tabella 46.3 sono riportati la sequenza replicativa del virus e i possibili inibitori.

I virus infettano le cellule eucariote legandosi a uno o più recettori che sono generalmente proteine presenti sulla membrana plasmatica della cellula infettata (ad esempio il CD4 per il virus HIV). Una volta saldamente ancorato a siti specifici sulla membrana, il virus può fondersi con la membrana cellulare, spogliarsi del suo capsido e riversare i suoi acidi nucleici nel citoplasma dell'ospite. In alternativa il complesso virus-recettore/i viene internalizzato per endocitosi e convogliato nel compartimento endosomale; endocitosi mediata da recettore, vedi Capitolo 6 e **CD**: Approfondimento 6.3). Il pH acido di questo compartimento favorisce la fusione del capsido virale con le membrane intracellulari e il virus rilascia nel citoplasma dell'ospite i suoi acidi nucleici che, utilizzando la stessa macchina sintetica della cellula, determineranno la formazione di nuove particelle virali. Nel caso di retrovirus come l'HIV, virus a RNA, una trascrittasi inversa virale provvede a retrotrascrivere il DNA dall'RNA che viene poi integrato nel genoma della cellula ospite. Per altri virus a RNA con polarità positiva (picornavirus e coronavirus), lo stesso RNA virale funge da mRNA e viene tradotto in un peptide gigante (che è successivamente tagliato in modo da generare proteine virali distinte. La produzione di virus avviene utilizzando la macchina sintetica della cellula ospite: il DNA virale viene amplificato grazie all'intervento di DNA polimerasi di origine virale. Le proteine, sintetizzate su ribosomi liberi o del reticolo rugoso, possono essere modificate

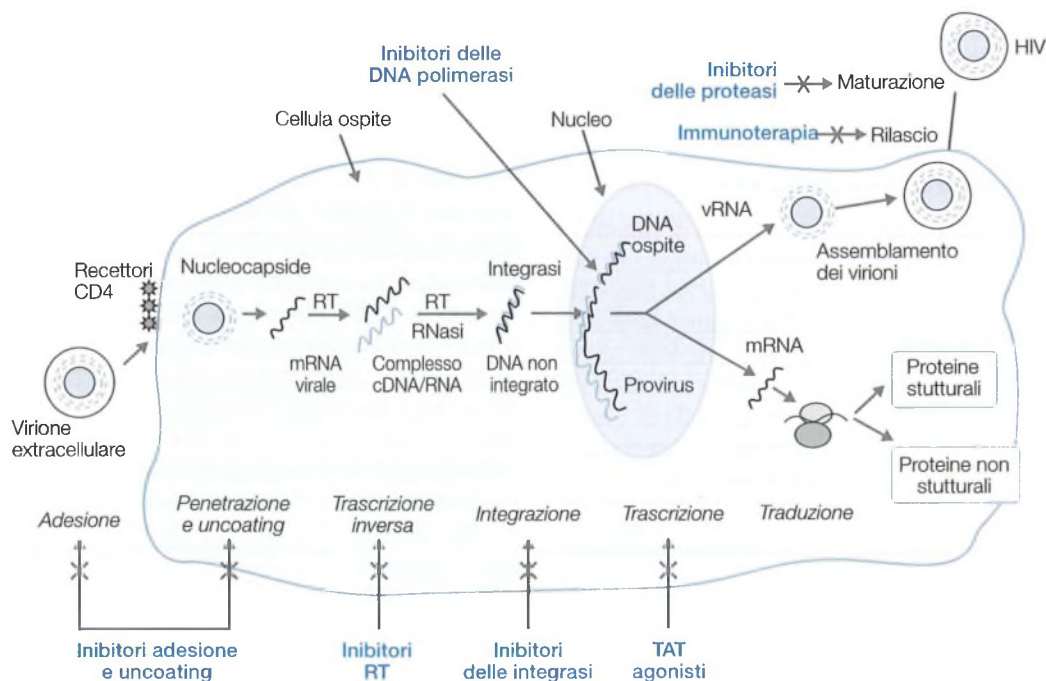


FIGURA 46.13 Ciclo replicativo dell'HIV-1, esempio di retrovirus, con i siti d'azione di farmaci antivirali. RT: trascrittasi inversa; cDNA: DNA complementare; mRNA: RNA messaggero; TAT: proteina che regola la trascrizione virale e influenza la velocità di replicazione; vRNA: RNA virale.

post-traduzionalmente prima di essere assemblate nel capsid virale. I virus, completi dei propri acidi nucleici, possono essere rilasciati nello spazio extracellulare per un meccanismo attivo o a seguito di lisi cellulare. Teoricamente è possibile intervenire sul ciclo virale a ogni livello del suo processo replicativo.

Inibitori della replicazione del DNA virale

La maggior parte degli inibitori della replicazione del DNA virale è costituita da derivati dei nucleosidi delle purine (che comprendono gli analoghi della 6-amminopurina e 6-ossipurina), e delle pirimidine, tra cui l'uracile, i derivati citosinici e isocitosinici, le tiopirimidine e le 6-azapirimidine.

Aciclovir ganciclovir, famciclovir, penciclovir Prototipo di questa classe di farmaci antivirali erpetici (HSV) è l'aciclovir. Esso viene incorporato dalle cellule e fosforilato ad aciclovir monofosfato (aciclo-GMP) dalla timidina chinasi. L'aciclovir e i suoi analoghi (ganciclovir, famciclovir e penciclovir) vengono fosforilati dalla timidina chinasi dei virus herpes simplex 1 e 2 (o da una fosfotransferasi del citomegalovirus nel caso del ganciclovir) con un'efficienza che è notevolmente superiore rispetto a quella della cellula ospite. Aciclo-GMP viene poi fosforilato da enzimi cellulari a composti di- e tri-fosforilati (aciclo-GDP e aciclo-GTP) che sono altamente idrofili e non riescono quindi a diffondere al di fuori della cellula (Figura 46.14). Come conseguenza, le concentrazioni di derivati fosforilati di farmaco sono fino a 200 volte più alte nelle cellule infettate rispetto alle cellule sane.

Aciclo-GTP (e i derivati trifosfati di questa classe di farmaci) compete con la deossiguanosina trifosfato per essere incorporato nel DNA e anche in questo caso il farmaco è un substrato molto migliore per la polimerasi virale che per l'enzima cellulare. Il legame di aciclo-GTP inibisce in modo competitivo la polimerasi. Nonostante ciò, esso viene incorporato nel DNA virale ma, poiché manca del gruppo 3'-idrossilico, non può legare altri nucleotidi e funge in pratica da terminatore della sintesi di acido nucleico; la catena nascente di DNA interrotta contenente aciclovir si lega alla polimerasi e la inibisce in modo irreversibile.

Resistenza di HSV ad aciclovir può avvenire con uno di questi tre meccanismi: produzione ridotta di timidina chinasi virale, alterata specificità della timidina chinasi per il substrato (ad esempio, la fosforilazione della timidina, ma non dell'aciclovir), alterata DNA polimerasi virale. Alterazioni degli enzimi virali sono causate da mutazioni puntiformi e inserzioni o delezioni di base nei geni corrispondenti. Il meccanismo di resistenza più comune negli isolati clinici di HSV è l'assente o carente attività della timidina chinasi virale; mutanti virali con DNA polimerasi alterata sono rari.

Iodoxuridina Questo farmaco è un nucleoside analogo della timidina che in seguito a fosforilazione interferisce con vari sistemi enzimatici virali, presenti nella famiglia degli HSV e coinvolti nel processo di replicazione. Gli effetti tossici riportati sono legati a una scarsa selettività

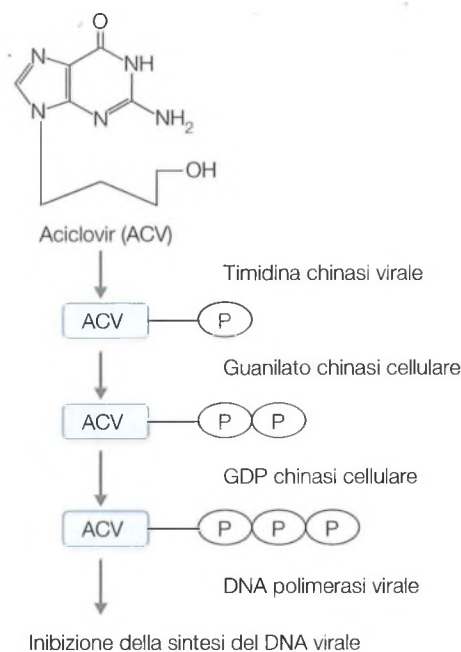


FIGURA 46.14 L'aciclovir è trasformato in monofosfato dalla timidina chinasi virale e successivamente in aciclovir di- e tri-fosfato da enzimi cellulari. Aciclovir è selettivamente attivato in cellule infette con herpesvirus in cui è facilmente convertito in aciclovir monofosfato dall'enzima timidina chinasi. L'incorporazione di aciclovir durante la replicazione del DNA virale porta ad arresto della sintesi del DNA e alla formazione di un complesso inattivo con la DNA polimerasi virale.

del farmaco, in quanto il derivato trifosfato della idoxuridina viene incorporato sia nel DNA virale che in quello delle cellule ospiti. Tale DNA, più facilmente soggetto a interruzione nella fase di trascrizione, porta alla sintesi di proteine virali alterate. Lo sviluppo di resistenze alla idoxuridina insorge con un'alta frequenza.

Vidarabina Questo farmaco è un nucleoside analogo dell'adenosina che inibisce in modo selettivo la sintesi del DNA virale. La forma trifosfato della vidarabina è prodotta da fosforilato chinasi cellulare che la fosforila con un'efficienza superiore rispetto a quella degli enzimi virali. Si ritiene che l'inibizione della DNA polimerasi nei virus del genere herpes simplex sia il meccanismo d'azione principale della vidarabina.

Foscarnet Chimicamente è l'acido fosfonoformico; agisce come inibitore non competitivo a livello dell'RNA polimerasi dei virus dell'influenza di tipo A e della DNA polimerasi di HSV-1 e HSV-2, citomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV), virus varicella-zoster (VZV) e virus dell'epatite B (HBV) a concentrazioni che non interferiscono con la polimerasi della cellula ospite. Foscarnet lega reversibilmente il sito di legame del pirofosfato della polimerasi virale e in questo modo inibisce in modo non competitivo il taglio del gruppo pirofosforico dal deossinucleotide trifosfato. A causa di questa inibizione viene bloccata la crescita dello stampo di DNA.

La resistenza a foscarnet non si instaura facilmente nell'uomo.

Fomivirsen È un oligonucleotide fosforotioato con 21-basi; è stata la prima terapia antisense approvata dalla FDA per le infezioni virali. È complementare alla sequenza di RNA messaggero per la regione di inizio della trascrizione di CMV e inibisce la replicazione CMV attraverso meccanismi sequenza-specifici e non specifici, inclusa l'inibizione del virus a legarsi alle cellule. Fomivirsen è attivo contro i ceppi di CMV resistenti a ganciclovir, foscarnet e cidofovir.

Fomivirsen viene somministrato mediante iniezione intravitreale nel trattamento della retinite da CMV nei pazienti intolleranti o che non rispondono ad altre terapie.

Farmaci attivi contro il virus dell'influenza

L'influenza è una malattia ubiquitaria ed è presente da millenni nella popolazione umana, infatti le prime descrizioni di epidemie influenzali risalgono al V secolo avanti Cristo in Grecia e nel corso dei secoli si sono manifestate epidemie più o meno gravi o pandemie con un aumento della morbilità e della mortalità.

Sono stati identificati tre tipi di virus influenzali: il *tipo A* e il *tipo B* responsabili della sintomatologia influenzale classica e il *tipo C* di scarsa importanza dal punto di vista clinico in quanto responsabile di un'infezione generalmente asintomatica o simile al raffreddore comune. Alla base dell'epidemiologia dell'influenza vi è la tendenza di tutti i virus influenzali a variare, cioè ad acquisire cambiamenti nelle proteine di superficie che permettono loro di aggirare la barriera costituita dall'immunità presente nella popolazione dovuta a pregresse infezioni. La vaccinazione antinfluenzale costituisce l'intervento medico maggiormente capace di prevenire la malattia. A livello farmacologico disponiamo di quattro composti, i due adamantani, oseltamivir e zanamivir.

Adamantani È una classe di farmaci capaci di interferire sull'"uncoating" (spogliazione dell'involucro esterno) virale dei virus dell'influenza di tipo A. Benché il composto più conosciuto sia l'amantadina, la rimantadina è il farmaco che ha il profilo farmaco-terapeutico migliore. L'amantadina inibisce l'uncoating, cioè la fase iniziale del processo di replicazione virale. Il sito di legame è molto probabilmente rappresentato dalla proteina virale M₂, una proteina della membrana virale con funzioni di canale e necessaria per acidificare l'interno del virus, evento da cui dipende la dissociazione delle ribonucleoproteine dalla membrana virale e quindi il trasferimento del codice virale nel citoplasma della cellula. Il farmaco non interferisce con il legame del virus dell'influenza A alla membrana della cellula ospite, né con la successiva endocitosi, ma si accumula a livello endo- e lisosomale innalzando il pH di questi organelli. È probabile che ciò ostacoli la fusione della membrana virale con quella della cellula ospite. Inoltre, l'alterato funzionamento della proteina M₂ e i disturbi del pH all'interno degli organelli citoplasmatici sono probabilmente anche responsabili

di alterazioni nel corso della sintesi e della maturazione dell'emagglutinina virale neosintetizzata e quindi dell'assemblaggio del capsido virale. L'effetto finale di questa classe di farmaci è rappresentato dal blocco della replicazione virale.

Sono stati riportati diversi casi di ceppi resistenti agli adamantani. La resistenza che si sviluppa è crociata con tutti i farmaci appartenenti a questa classe ed è trasmissibile da ceppo a ceppo. Tale resistenza è associata a mutazioni degli amminoacidi in posizione 27, 30 e 31, della proteina M₂.

Oseltamivir e zanamivir Sono inibitori della neuraminidasi virale. La neuraminidasi del virus dell'influenza lega i residui di acido sialico terminale e distrugge i siti di attacco riconosciuti dall'emoagglutinina virale che sono presenti sulla superficie cellulare e nelle secrezioni respiratorie. Questa azione enzimatica è essenziale per il rilascio del virus dalle cellule infette. L'interazione di oseltamivir e zanamivir con le neuraminidasi provoca un cambiamento conformazionale all'interno del sito attivo dell'enzima e inibisce la sua attività. L'inibizione dell'attività della neuraminidasi virale porta ad aggregazione alla superficie delle cellule del virus e ridotta diffusione all'interno del tratto respiratorio. Varianti del virus con mutazioni nell'emoagglutinina e/o neuraminidasi presentano resistenza ai farmaci.

Farmaci attivi contro i virus dell'epatite

Il nuovo impulso alla ricerca dei meccanismi di base della replicazione virale ha portato allo sviluppo di un buon numero di farmaci per il trattamento del virus dell'epatite B (HBV) e del virus dell'epatite C (HCV).

Farmaci attivi principalmente contro il virus dell'epatite C

L'epatite C è una delle più comuni infezioni croniche da virus nei Paesi sviluppati ed è associata a significativa morbilità e mortalità. Se non è trattata, può causare progressivo danno epatocellulare con fibrosi e cirrosi finale e diventa anche un importante fattore di rischio per il carcinoma epatocellulare. Il virus a RNA non si integra nel DNA cromosomico, e quindi non diventa latente. Pertanto l'infezione è, in teoria, curabile in tutti gli individui colpiti. L'attuale standard di cura per il trattamento è una combinazione di interferone α e ribavirina, che produce un alto tasso di guarigione in genotipi del virus selezionati. Il recente l'avvento di farmaci orali altamente efficaci, tra cui gli inibitori della proteasi HCV e gli inibitori della polimerasi, può portare alla speranza che la terapia di questa infezione cambierà radicalmente nel prossimo decennio con esiti molto positivi.

Interferoni (IFN) Sono citochine che possiedono potenti attività antivirali, immunomodulatorie e antiproliferative. Queste proteine sono sintetizzate da cellule ospiti in risposta a vari induttori e, a loro volta, possono causare cambiamenti biochimici che conducono a un effetto antivirale nelle cellule. Attualmente sono riconosciute tre

classi principali di interferoni umani con significativa attività antivirale. Per l'epatite C, clinicamente è usato IFN ricombinante, costituito da proteine non glicosilate di circa 19.500 Da. Le forme pegilate sono ormai le più usate nella pratica clinica.

Il meccanismo di azione è molto complesso e viene qui riassunto. A seguito del legame a specifici recettori cellulari gli IFN attivano la via JAK-STAT di trasduzione del segnale e portano alla traslocazione nucleare di un complesso proteico che si lega ai geni contenenti un elemento di risposta IFN-specifico. Questo, a sua volta, porta alla sintesi di molte proteine che contribuiscono alla resistenza virale mediata nelle diverse fasi della penetrazione virale.

L'inibizione della sintesi proteica è il principale effetto inibitorio per molti virus. Le proteine IFN-indotte includono 2'-5'-oligoadenilato [2-5 (A)] sintetasi e una proteina chinasi, ciascuna delle quali può inibire la sintesi proteica, in presenza di RNA a doppia elica. Il 2-5 (A) sintetasi produce oligomero-cicliasi che attivano una endoribonucleasi latente (RNase L) che taglia sia RNA cellulare che virale a singolo filamento. La proteina chinasi fosforila selettivamente e disattiva il fattore di iniziazione 2 (eIF-2) proteina coinvolta nella sintesi proteica. La proteina chinasi IFN-indotta può anche essere un effettore importante di apoptosi. Inoltre, IFN induce una fosfodiesterasi che inattiva una porzione di RNA transfer e quindi impedisce l'allungamento del peptide. Un virus, può essere inibito in diverse fasi, e il principale effetto inibitorio può essere diverso nelle famiglie di virus.

Alcuni virus sono in grado di contrastare gli effetti di IFN bloccando la produzione o l'attività di proteine IFN-inducibile. Ad esempio, resistenza del virus dell'epatite C a IFN è da attribuire, tra gli altri meccanismi, alla inibizione della proteina chinasi IFN-indotta.

Ribavirina Questo farmaco è un analogo sintetico della guanosina con attività antivirale ad ampio spettro; agisce infatti sia su virus a DNA che su virus a RNA. La ribavirina viene fosforilata da enzimi cellulari e trasformata in forme monofosfato, difosfato e trifosfato. Si ritiene che questo farmaco espliciti l'attività antivirale in quanto capace di diminuire la concentrazione intracellulare di nucleotidi o di inibire il *capping* dell'mRNA o dell'RNA polimerasi dei virus. Studi sui meccanismi d'azione hanno dimostrato che la rilevanza dell'inibizione dei sistemi enzimatici è diversa nei vari gruppi di virus.

La comparsa di resistenza virale alla ribavirina non è comune nella maggior parte dei virus, ma è stata riportata in HCV. Il meccanismo sembra correlato alla mancata fosforilazione della ribavirina nella forma attiva.

La ribavirina è anche altamente embrio- e fetotossica.

Inibitori delle proteasi Diversi inibitori della proteasi sono in studio sia in monoterapia che in combinazione con i farmaci classici dell'epatite C. I due farmaci prossimi all'impiego clinico sono telaprevir e boceprevir che hanno dimostrato di essere efficaci nel ridurre la carica virale in vari studi clinici.

Il meccanismo d'azione è diretto verso una specifica pro-

teina del complesso di proteasi coinvolte nella formazione dei virioni. Il HCV RNA codifica un unico precursore poliproteico che viene trasformato enzimaticamente da proteasi dell'ospite e virali. La porzione N-terminale del polipeptide è tagliata da proteasi della cellula ospite le quali generano 3 proteine strutturali (core, glicoproteine E1 ed E2 del capsido) e P7 (una proteina di membrana la cui funzione non è ancora stata definitivamente stabilita). Il resto del polipeptide contiene 6 proteine non strutturali (NS) necessarie per la maturazione e replicazione virale, tra cui NS3, un enzima multifunzionale con una proteasi N-terminale a serina e un C-terminale con un dominio RNA elicasi /NTPase. Il processo proteasico viene completato da NS4A un cofattore essenziale per l'attività peptidasi completa. Alla fine si forma una proteasi eterodimerica denominata NS3-4A che viene specificamente inibita da boceprevir e taleprevir. Questa proteina è un substrato specifico del virus e non della cellula ospite.

Farmaci attivi contro il virus dell'epatite B

A differenza dei virus dell'epatite C, il virus dell'epatite B è trascritto da DNA che può essere integrato nel DNA cromosomico della cellula ospite ed è in grado di stabilire una infezione cronica in circa il 10% dei pazienti. I pazienti con HBV cronica possono sviluppare epatite attiva che può portare a fibrosi e cirrosi, con un'incidenza notevolmente aumentata di carcinoma epatocellulare. L'interferone o una combinazione di interferone e ribavirina sono risultati in grado di curare i pazienti con infezione cronica; tuttavia, questa terapia è associata a un alto tasso di effetti collaterali, che spesso porta alla sospensione precoce del trattamento. Diversi nucleosidici antiretrovirali o analoghi di nucleotidi inibitori della polimerasi, tra cui lamivudina, telbivudina e tenofovir, hanno una potente attività anti-HBV e hanno fornito una terapia orale alternativa singola o di combinazione. Questi regimi sono molto meglio tollerati rispetto combinazioni contenenti IFN.

Adefovir È un nucleotide aciclico fosfonato analogo di adenosina monofosfato. In terapia viene usato l'adefovir dipivoxil che è un profarmaco diestere che una volta entrato nelle cellule viene de-esterificato ad adefovir. È inibitorio in vitro contro una serie di virus a DNA ed RNA, ma il suo utilizzo clinico è limitato alle infezioni da HBV. Adefovir viene trasformato dagli enzimi cellulari in difosfato, che agisce come un inibitore competitivo della DNA polimerasi virale e della transcriptasi inversa e agisce anche come terminatore di catena di sintesi del DNA virale. La sua selettività è dovuta a una maggiore affinità per polimerasi dell'HBV rispetto a quella cellulare. La resistenza ad adefovir è stata individuata in una piccola percentuale (~ 4%) di pazienti con infezione cronica da HBV nel corso dei 3 anni di trattamento. La resistenza è dovuta a mutazioni puntiformi nella polimerasi dell'HBV, che non interferiscono con la sensibilità alla lamivudina.

Entecavir, lamivudina, telbivudine Sono analoghi nucleosidici della guanosina (entecavir), della citidina (lamivu-

dina) e della timidina (telbivudina) con attività abbastanza selettiva contro l'HBV DNA polimerasi. I farmaci vengono fosforilati a livello intracellulare a una forma trifosfato che compete con i rispettivi nucleosidi trifosfato endogeni e inibisce tutte le attività della polimerasi dell'HBV.

La resistenza si sviluppa principalmente per mutazioni puntiformi nella polimerasi virale o per un eccesso di produzione di DNA polimerasi virale.

Farmaci attivi contro l'HIV

Si ritiene che la malattia causata dall'HIV abbia avuto origine nell'Africa subsahariana per mutazione di un retrovirus animale, forse della scimmia, che nel XX secolo fu trasmesso alla popolazione umana provocando poi una epidemia globale. La UNAIDS e il WHO hanno stimato che ci siano stati 25 milioni di morti dalla scoperta della sindrome, il che ne ha fatto una delle più terribili epidemie della storia. Solo nel 2005 sono stati stimati circa 3,1 milioni di morti di cui 570.000 bambini. Globalmente, si stima che le persone affette dall'HIV siano 33 milioni circa (fonte UNAIDS, 2007). Solo nel 2005, tra i 4,3 e i 6,6 milioni di persone sono state infettate e tra i 2,8 e i 3,6 milioni di persone sono decedute per l'AIDS. Il valore più alto dal 1981.

L'HIV è un tipico retrovirus con un piccolo genoma a RNA di 9.300 paia di basi. Due copie del genoma sono contenute in un capsido circondato da un doppio strato lipidico che deriva dalla membrana plasmatica della cellula ospite (Figura 46.13). Il genoma virale presenta tre principali regioni di lettura: *gag* codifica per una poliproteina che viene elaborata per liberare le principali proteine strutturali del virus; *pol* sovrappone *gag* e codifica per tre importanti attività enzimatiche: una DNA polimerasi RNA-dipendente o trascrittasi inversa con attività RNAase, una proteasi e una integrasi virale; ed *env* che codifica per una grossa proteina transmembrana responsabile dell'ingresso del virus nella cellula. Inoltre nel genoma sono presenti diversi piccoli geni (*tat*, *rev*, *nef*, *vpr*) che codificano proteine regolatrici che aumentano la produzione di virioni o antagonizzano le difese dell'ospite.

Attualmente, l'infezione da HIV viene trattata con la cosiddetta *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART), nella quale si utilizzano opportune combinazioni di farmaci antiretrovirali. Il suo utilizzo, a partire dal suo ingresso nel 1995, ha consentito di ridurre la morbilità e la mortalità degli individui che sono stati infettati dal virus. La terapia HAART ha ridotto drasticamente la mortalità e previene la progressione della malattia causata dall'HIV. La terapia farmacologica dell'infezione da HIV è un campo in rapido movimento e sono disponibili per l'uso clinico numerosi farmaci antiretrovirali (Tabella 46.3). Grazie a queste cure, l'AIDS da malattia mortale è diventata una malattia cronica. La strategia della terapia HAART è quella di utilizzare in associazione classi diverse di farmaci per diminuire la resistenza dei virus, di utilizzare un numero ridotto di farmaci in modo da avere una riserva in caso di resistenza e di iniziare la

TABELLA 46.3 Antiretrovirali approvati per uso clinico

Classe	Farmaco	Abbreviazione
Inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa	Zidovudine	ZDV; (AZT)
	Didanosine	ddI
	Stavudine	d4T
	Zalcitabine	DDC
	Lamivudine	3TC
	Abacavir	ABC
	Tenofovir disoproxil	TDF; (PMPA)
	Emtricitabine	FTC
Inibitori della trascrittasi inversa non nucleosidici	Nevirapine	NVP
	Efavirenz	EFV
	Delavirdine	DLV
	Etravirine	ETV
Inibitori della proteasi	Saquinavir	SQV
	Indinavir	IDV
	Ritonavir	RTV
	Nelfinavir	NFV
	Amprenavir	APV
	Lopinavir	LPV/r
	Atazanavir	ATV
	Fosamprenavir	FPV
	Tipranavir	TPV
	Darunavir	DRV
	Inibitori dell'ingresso	Enfuvirtide
Maraviroc		MVC
Inibitori delle integrasi	Raltegravir	RAL

terapia nelle fasi iniziali dell'infezione. Il goal finale, l'eradicazione del virus dai depositi intracellulari in modo da estinguere l'infezione, non è ancora stato raggiunto.

Inibitori della trascrittasi inversa

La DNA polimerasi RNA-dipendente del virus HIV, detta anche trascrittasi inversa, converte l'RNA virale in DNA provirale che viene poi inserito in un cromosoma della cellula ospite. Inibitori disponibili di questo enzima sono analoghi nucleosidici/nucleotidi o inibitori non-nucleosidici.

Come tutti i farmaci disponibili antiretrovirali, gli inibitori nucleosidici e nucleotidici della trascrittasi inversa prevengono l'infezione di cellule sensibili, ma non eliminano il virus dalle cellule che già portano integrato il DNA provirale. Analoghi nucleosidici e nucleotidici devono entrare nelle cellule dove vengono fosforilati e per competizione o incorporamento terminano l'allungamento del nascente DNA provirale. Tutti tranne uno dei farmaci di questa classe sono nucleosidi che devono essere tri-fosforilati per esercitare l'attività. L'unica eccezione è tenofovir che richiede due fosfati per acquisire piena attività. Questi composti inibiscono sia HIV-1 che HIV-2, e alcuni sono ad attività ad ampio spettro contro altri

retrovirus umani e animali; emtricitabina, lamivudina e tenofovir sono attivi anche contro il virus dell'epatite B (HBV), e tenofovir è anche attivo contro i virus erpetici

Inibitori non nucleosidici della trascrittasi inversa

Gli inibitori non-nucleosidici della trascrittasi inversa (NNRTI) includono una varietà di composti che si legano a una tasca idrofobica della subunità p66 della trascrittasi inversa di HIV-1. La tasca degli NNRTI non è essenziale per la funzione dell'enzima ed è distante dal sito attivo, ma questi composti inducono un cambiamento conformazionale della struttura tridimensionale dell'enzima che riduce notevolmente la sua attività e, quindi, agiscono come inibitori non competitivi. A differenza dei nucleosidi e nucleotidi inibitori della trascrittasi inversa, questi composti non necessitano di fosforilazione intracellulare per conseguire l'attività. Poiché il sito di legame per gli NNRTI è virus-ceppo-specifico, gli agenti sono attivi contro l'HIV-1, ma non contro l'HIV-2 o altri retrovirus e non devono essere usati per trattare l'infezione da HIV-2. Inoltre queste sostanze non hanno attività contro la polimerasi del DNA della cellula ospite. I due agenti più comunemente usati in questa categoria sono efavirenz e nevirapina.

Inibitori della proteasi dell'HIV

Gli inibitori della proteasi dell'HIV sono sostanze chimiche simil-peptidiche che inibiscono competitivamente l'azione dell'aspartil-proteasi del virus. Questa è una proteasi omodimerica composta da due monomeri di 99-amminoacidi; ogni monomero presenta un residuo di acido aspartico che è essenziale per la catalisi. Il sito di taglio preferito per questo enzima è il lato N-terminale dei residui di prolina, in particolare tra fenilalanina e prolina. Le aspartil-proteasi umane (renina, pepsina, gastrina e catepsine D ed E) contengono una sola catena polipeptidica e non sono significativamente inibite dagli inibitori delle proteasi dell'HIV.

Questi farmaci impediscono l'attività proteolitica codificata *gag* e polipeptidi precursori strutturali (P17, P24, P9, e P7) ed enzimatici (trascrittasi inversa, proteasi e integrasi) e componenti del virus codificati da *pol*. Ciò impedisce il passaggio di particelle infettive del virus HIV alla loro forma matura. La resistenza richiede l'accumulo di mutazioni multiple di resistenza.

La mutazione primaria di resistenza a saquinavir si verifica nel codone della proteasi HIV 90 (a sostituzione leucina- con-metionina), accanto alla resistenza primaria è stata segnalata come importante una sostituzione glicina-con-valina al codone 48. Mutazioni di resistenza secondaria si verificano ai codoni 36, 46, 82, 84, e altri. Di solito esiste una resistenza crociata con la maggior parte di altri inibitori della proteasi HIV.

Inibitori dell'ingresso del virus nelle cellule

Due farmaci sono disponibili in questa classe enfuvirtide, e maraviroc, che hanno differenti meccanismi di azione. Enfuvirtide è un peptide sintetico di 36 amminoacidi la cui sequenza è derivata da una parte della regione trans membrana gp41 di HIV-1 che è coinvolta nella fusione del doppio strato lipidico della membrana del virus con quello della membrana della cellula ospite. La sua azione farmacologica è volta alla inibizione del legame del virus alla cellula ospite. Enfuvirtide non è attiva contro l'HIV-2. Maraviroc blocca il legame della proteina gp120 del rivestimento esterno del virus al recettore per le chemochine CCR5. In questo modo evita l'ingresso del virus nella cellula. Un altro antagonista del recettore CCR5, vicriviroc, è in avanzata fase di sviluppo clinico. La resistenza si può manifestare in mutanti del virus che non utilizzano CCR5 per l'entrata nella cellula.

Inibitori delle integrasi

L'integrazione cromosomica è una caratteristica distintiva dei cicli di vita dei retrovirus e permette al DNA virale di rimanere nel nucleo della cellula ospite per un lungo periodo di inattività o di latenza. Poiché il DNA umano non è noto subire l'escissione e la reintegrazione, questo è un obiettivo eccellente per l'intervento antivirale. Il primo inibitore dell'integrasi dell'HIV approvato, il raltegravir, è stato autorizzato nel 2007. Previene la formazione di legami covalenti tra il DNA virale e quello dell'ospite, bloccando l'attività catalitica della integrasi di HIV e impedendo, così, l'integrazione del DNA virale nel cromosoma ospite. Raltegravir mantiene l'attività contro i virus che sono diventati resistenti agli agenti antiretrovirali di altre classi a causa del suo meccanismo d'azione unico.

Le due principali vie di resistenza al raltegravir coinvolgono mutazioni nel gene dell'integrasi.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'introduzione dei farmaci antimicrobici ha portato oggi al controllo delle malattie infettive. L'emergere di resistenza a questi farmaci potrebbe ridurre drasticamente i benefici ottenuti.
- ▶ I farmaci antibatterici vengono distinti in batteriostatici e battericidi, a seconda che essi siano in grado di bloccare la duplicazione batterica o di provocare la morte del microrganismo.
- ▶ Le funzioni batteriche inibite dagli antibiotici possono essere schematicamente suddivise in: sintesi del peptidoglicano della parete cellulare, trascrizione del DNA e traduzione dell'RNA, sintesi e replicazione del DNA, funzioni della membrana citoplasmatica, metabolismo cellulare.
- ▶ Lo sviluppo di resistenza si può verificare a causa di: ridotto ingresso dell'antibiotico all'interno del batterio; aumento dell'eliminazione dell'antibiotico mediato da pompe di efflusso; rilascio di enzimi microbici capaci di inattivare l'antibiotico; alterazione delle proteine microbiche che trasformano pro-farmaci in frazioni attive; alterazione delle proteine bersaglio; sviluppo di percorsi metabolici alternativi a quelli inibiti dall'antibiotico.
- ▶ L'emergere di resistenza è in gran parte facilitato dall'uso terapeutico non adeguato e dall'uso indiscriminato degli antibiotici a scopo agricolo e zootecnico.
- ▶ Il trattamento delle infezioni fungine sistemiche, oltre che sull'uso di amfotericina B, si basa sulla somministrazione di inibitori di componenti della parete cellulare e della membrana citoplasmatica, inibitori di vie metaboliche enzimatiche e inibitori della mitosi.
- ▶ La resistenza ai farmaci antifungini si sviluppa con una frequenza minore rispetto agli antibatterici ed è dovuta a mutazioni nei geni che codificano i bersagli degli antifungini.
- ▶ Sono stati trovati nuovi farmaci ad attività antivirale soprattutto contro il virus che causa l'AIDS e anche contro i virus che causano epatiti.
- ▶ I farmaci antivirali agiscono con uno o più dei seguenti meccanismi: inattivazione del virus prima del riconoscimento o della penetrazione nella cellula ospite; inibizione dell'interazione con i recettori per il virus presenti sulla membrana della cellula ospite; inibizione dell'"uncoating" virale; inibizione dell'integrazione del DNA virale nel genoma dell'ospite; inibizione della trascrizione e traduzione di mRNA e proteine virali; alterazione delle varie fasi di formazione del capsido e del rilascio del virus.

Bibliografia essenziale

- ▶ Anglemyer A, Rutherford GW, Egger M, Siegfried N. Antiretroviral therapy for prevention of HIV transmission in HIV-discordant couples. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;5:CD009153.
- ▶ Barabote RD, Thekkiniath J, Strauss RE et al. Xenobiotic efflux in bacteria and fungi: a genomics update. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 2011;77:237-306.
- ▶ Fernández L, Breidenstein EB, Hancock RE. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist Updat* 2011;14:1-21.
- ▶ Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I, Lee RE. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nat Rev Microbiol* 2010;9:62-75.
- ▶ Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:423-35.
- ▶ Koul A, Arnoult E, Lounis N et al. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature* 2011;469(7331):483-90.
- ▶ Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:590-603.
- ▶ Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9:719-27.
- ▶ Perno CF. The discovery and development of HIV therapy: the new challenges. *Ann Ist Super Sanita* 2011;47:41-3.
- ▶ Türel O. Newer antifungal agents. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011;9:325-38.

Strategie farmacologiche nell'inflammatione

CAPITOLO

47

Salvatore Cuzzocrea, Maria Antonietta Catania

Obiettivi formativi

- ▶ Acquisire nozioni di base sugli eventi cellulari e molecolari che sottendono la risposta infiammatoria
- ▶ Acquisire concetti di base sul pathway infiammatorio (costituito da induttori, mediatori ed effettori) che coordina e condiziona il tipo di risposta infiammatoria
- ▶ Acquisire i concetti di base per comprendere il meccanismo d'azione dei farmaci antinfiammatori e le motivazioni delle diverse strategie terapeutiche

L'inflammatione è una risposta adattativa scatenata da stimoli e condizioni irritative, come ad esempio un'infezione o una lesione.

Essa è sottesa da eventi cellulari e molecolari, in larga parte noti per quanto concerne gli eventi acuti, meno per gli eventi cronici, presumibilmente legati a squilibri di sistemi fisiologici non direttamente correlati alle difese dell'organismo o ai processi di riparazione.

Si ritiene che, generalmente, una risposta infiammatoria controllata sia un evento utile (ad esempio, come difesa da un'infezione), mentre diventa dannosa se sregolata (come quando innesca uno shock settico).

Questo fa presumere che, nell'ambito di un processo patologico, possano coesistere entrambe le anime dell'inflammatione (fisiologica e non), ma mentre questi due aspetti sono chiaramente evidenti nel caso delle infezioni, in altre condizioni patologiche la componente fisiologica non solo non è altrettanto delineata, ma non si è certi neanche della sua esistenza (Figura 47.1).

Indipendentemente dalla causa, l'inflammatione tende a evolvere come una risposta adattativa, nel tentativo di ristabilire l'omeostasi

A livello basale, la risposta infiammatoria acuta scatenata da un'infezione o da una lesione coinvolge il reclutamento coordinato di componenti ematiche, quali plasma e leucociti, nel sito interessato dalla noxa patogena. Questa risposta è stata ben caratterizzata per le infezioni microbiche, specialmente quelle batteriche, innescata dai recettori del sistema immunitario innato. Il riconoscimento iniziale dell'infezione è mediato dai macrofagi tissutali e dalle mastcellule, portando alla produzione di

diversi mediatori dell'inflammatione, come chemochine, citochine, ammine vasoattive, eicosanoidi e prodotti della cascata proteolitica. Il principale e più immediato effetto di questi mediatori è quello di produrre localmente un essudato infiammatorio: le proteine plasmatiche e i leucociti (soprattutto neutrofili), normalmente confinati nel torrente vascolare, guadagnano l'accesso ai tessuti extravascolari sede dell'infezione/lesione, attraverso le venule post-capillari. L'endotelio vascolare attivato porta allo stravasamento selettivo di neutrofili, evitando invece la fuoriuscita di eritrociti.

Questa selettività è garantita dal legame inducibile delle selectine delle cellule endoteliali con i recettori per le integrine e le chemochine presenti sui leucociti, che si instaura sulla superficie endoteliale e negli spazi extravascolari (dove le proteine plasmatiche appena depositate formano una matrice provvisoria per il legame con le integrine dei leucociti). Quando raggiungono il tessuto danneggiato, i neutrofili vengono attivati dal contatto diretto con i patogeni o attraverso l'azione di citochine secrete da cellule tissutali. I neutrofili tentano di uccidere gli agenti invalidanti rilasciando i contenuti tossici dei loro granuli, come le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), la proteinasi 3, la catepsina G e le elastasi. Questi effettori altamente potenti non discriminano tra microbi e cellule ospiti, determinando inevitabilmente un danno tissutale. Una risposta infiammatoria acuta efficace porta all'eliminazione degli agenti infettivi e alla successiva risoluzione del processo patologico con avvio di una fase di riparazione, mediata soprattutto dalle cellule residenti a livello tissutale e dai macrofagi reclutati.

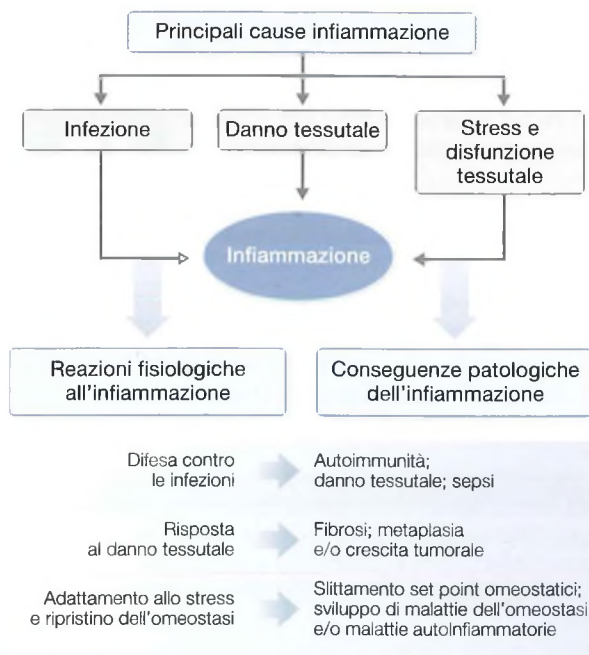


FIGURA 47.1 Cause dell'infiammazione.

■ Dall'infiammazione acuta a quella cronica

Il passaggio dalle prostaglandine proinfiammatorie alle lipossine antinfiammatorie è cruciale per la transizione dall'infiammazione alla sua risoluzione.

Le lipossine inibiscono il reclutamento dei neutrofili e promuovono quello dei monociti, in grado di rimuovere le cellule morte e avviare il remodelling tissutale. Resolvine e protectine, che sono altri mediatori lipidici, così come il transforming growth factor- β e i fattori di crescita prodotti dai macrofagi, giocano anch'essi un ruolo cruciale nella risoluzione dell'infiammazione e nell'avvio dei processi di riparazione.

Se la risposta infiammatoria acuta non riesce a eliminare il patogeno, il processo infiammatorio persiste e acquisisce nuove caratteristiche.

L'infiltrato neutrofilo è sostituito dai macrofagi e nel caso di infezioni anche da cellule T. Se l'effetto combinato di queste cellule è ancora insufficiente, si instaura un processo infiammatorio cronico, con formazione di granulomi e tessuti linfoidei terziari.

Le caratteristiche di questo stato infiammatorio possono differire in base alla classe di effettori di cellule T che sono presenti. In aggiunta alla persistenza dei patogeni, l'infiammazione cronica può derivare anche da altre cause di danno tissutale come le risposte autoimmuni (caratterizzate dalla presenza di auto-antigeni) o la presenza di corpi estranei non degradabili.

Il fallimento da parte dei macrofagi di inglobare e distruggere i patogeni o i corpi estranei può portare alla formazione di granulomi, in cui gli "intrusi" sono circondati da strati di macrofagi, nel tentativo ultimo di proteggere l'ospite.

I meccanismi che sottendono l'infiammazione da infezione sono molto più caratterizzati rispetto a quelli di altri processi infiammatori, ma non è chiaro come

le conoscenze relative alle infezioni possano essere applicate ad altri tipi di infiammazione. I meccanismi dell'infiammazione cronica sistemica sono scarsamente compresi, ma è acclarato che non rientrano nel classico pattern di transizione da infiammazione acuta a infiammazione cronica.

■ Al pathway infiammatorio contribuiscono induttori, mediatori ed effettori

La risposta infiammatoria è coordinata da un ampio range di mediatori che formano delle complesse reti di regolazione.

Il pathway infiammatorio è costituito da induttori, mediatori ed effettori, e ognuno di questi componenti determina il tipo di risposta infiammatoria (Figura 47.2). Si riconoscono sia induttori che mediatori di infiammazione. Gli induttori sono segnali che avviano la risposta infiammatoria, attivando degli appositi sensori i quali a loro volta stimolano la produzione di mediatori specifici. I mediatori alterano lo stato funzionale di organi e tessuti (effettori dell'infiammazione) in modo da favorire l'adattamento alle condizioni stabilite dagli induttori dell'infiammazione.

Induttori e sensori di infiammazione

Gli induttori possono essere sia esogeni che endogeni e gli induttori esogeni possono essere classificati in due gruppi: induttori microbici e non microbici.

I sensori dell'infiammazione sono un gruppo di complessi di proteine, chiamati inflammosomi, capaci di riconoscere gli stimoli che inducono l'infiammazione e che controllano la produzione di citochine pro-infiammatorie.

Induttori microbici

Gli induttori microbici possono essere a loro volta suddivisi in *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) e fattori di virulenza (Box 1).

La prima classe di induttori microbici, PAMP, è un insieme circoscritto e definito di pattern molecolari veicolati dai microrganismi di una determinata classe (sia patogeni che commensali). I PAMP sono "definiti" nel senso che l'ospite possiede un corrispondente set di recettori (*pattern-recognition receptors*) in grado di rilevarne la presenza.

La seconda classe di induttori microbici comprende diversi fattori di virulenza ed è circoscritta ai patogeni. A differenza dei PAMP, non sono riconosciuti direttamente da recettori dedicati.

Gli effetti della loro attività, soprattutto gli effetti avversi sui tessuti dell'ospite, scatenano la risposta infiammatoria. Le attività tipiche dei fattori di virulenza possono essere rilevate da sensori specializzati. Ad esempio, le esotossine formanti pori prodotte dai batteri Gram-positivi sono rilevate dall'inflammosoma NALP3 (NACHT-, *leucine-rich-repeat-and pyrin-domain-containing protein*), sensibile all'efflusso di ioni K^+ derivante dalla formazione del poro.

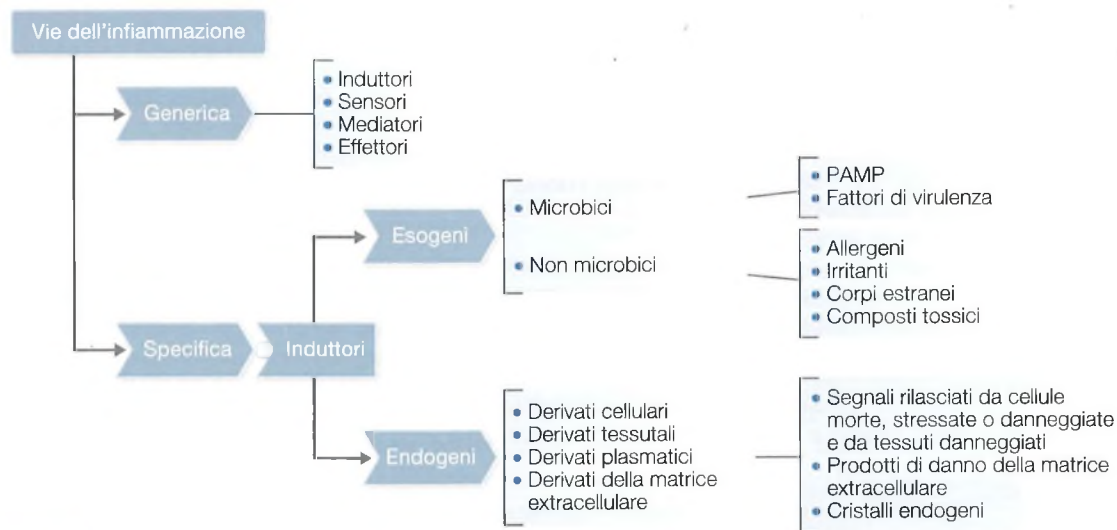


FIGURA 47.2 Vie dell'infiammazione.

Allo stesso modo, l'attività proteolitica delle proteasi prodotte dagli elminti è riconosciuta dai basofili. Questi meccanismi sensoriali possono essere inavvertitamente attivati da mimi funzionali: così allergeni che sono anche proteasi possono innescare il pathway indotto solitamente dagli elminti. Una via alternativa dell'attività di virulenza sensibilizzante non specifica né diretta rileva gli effetti sulla morte cellulare e sul danno tissutale. Le risposte infiammatorie indotte da questi due meccanismi differiscono nella loro specificità, in quanto la prima è caratteristica del patogeno (e in alcuni casi di una classe di patogeni), la seconda no. Queste risposte infiammatorie hanno differenti caratteristiche, che si traducono in esiti fisiologici e patologici distinti.

I mediatori microbici dell'infiammazione non derivano necessariamente da patogeni: anche i batteri commensali rappresentano una fonte importante di induttori dell'infiammazione.

Induttori non microbici

Gli induttori non microbici includono allergeni, irritanti, corpi estranei e composti tossici

Alcuni allergeni sono individuati perché mimano l'attività di virulenza dei parassiti; altri possono agire come irritanti sulle mucose. La risposta infiammatoria indotta da entrambi i tipi di allergeni è molto simile perché la difesa contro i parassiti e gli irritanti ambientali si basa sull'espulsione e sulla clearance attraverso l'epitelio delle mucose.

I sensori per gli allergeni sono ampiamente sconosciuti. I corpi estranei sono particelle non digeribili troppo grandi per essere fagocitate o in grado di danneggiare la membrana fagosomiale dei macrofagi. Le particelle di silice e asbesto sono esempi classici di corpi estranei in grado di evocare una risposta infiammatoria. Le loro dimensioni e la resistenza alla rimozione, così come la mancanza di auto-markers (come il CD47) normalmente presenti sulle

cellule autologhe e in grado di prevenire la fagocitosi (per inibizione dei recettori), favoriscono una presenza anomala nei tessuti. Il mancato auto-riconoscimento scatena presumibilmente un riflesso fagocitico nei macrofagi, ma le ampie dimensioni o la forma dei corpi estranei portano a una fagocitosi frustrata, in cui non si riesce a chiudere il fagosoma. Se un corpo estraneo è troppo grande perché si formi una coppa fagocitica, il macrofago forma un granuloma attorno al corpo estraneo.

Non è noto il sensore che innesci questa reazione nei macrofagi. In alcuni casi, i macrofagi possono fondersi formando delle cellule giganti che incapsulano il corpo estraneo. Indipendentemente dal fatto che il corpo estraneo sia troppo grande per essere fagocitato o distrutto, quando un macrofago incontra un corpo estraneo, il sensore NALP3 viene attivato.

Induttori endogeni dell'infiammazione sono segnali prodotti da tessuti danneggiati, malfunzionanti o sottoposti a stress

Gli induttori endogeni sono afferenti a diverse classi funzionali, a seconda della natura e del grado di alterazione tissutale in cui sono presenti; essi possono scatenare una risposta infiammatoria acuta o cronica.

Infiammazione acuta è prodotta dalla liberazione di molecole o organuli cellulari

Spesso, ma non sempre, in caso di danno acuto si assiste alla liberazione di cellule o molecole normalmente "sequestrate" all'interno di cellule o tessuti sani. Il sequestro di queste componenti (ad esempio, ligandi e loro recettori, enzimi e loro substrati ecc.) è garantito da diversi tipi di compartimentazione che interessano i tessuti sani. Esempi importanti sono i compartimenti delimitati da membrane cellulari (soprattutto quella plasmatica), membrane basali, epitelio di superficie ed endotelio vascolare, che vengono meno in caso di danno tissutale con fuoriuscita di materiale. Ad esempio:

▶ in seguito a un processo necrotico, la rottura della

BOX 1 Pattern recognition receptors

Di fronte a un microrganismo patogeno, le cellule del sistema immunitario riconoscono delle strutture chiamate *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP, costituiti da componenti microbici come parete cellulare, acidi nucleici, prodotti del metabolismo) attraverso specifici recettori, chiamati *pattern-recognition receptors*, di cui, a oggi, si conoscono le seguenti classi (Tabella 47.1):

- ▶ *Toll-Like Receptors* (TLR),
- ▶ *C-type Lectin Receptors* (CLR),
- ▶ *Cytoplasmic Pattern-Recognition Receptors*
 - *Nucleotide-binding Oligomerization Domain* (NOD), *Leucine-rich-repeat containing receptors* (NLR)
 - *Retinoic acid-inducible gene 1 protein* (RIG-I) *helicase receptors*

Questi recettori, la cui attivazione attraverso il legame con il loro specifico ligando innesca dei meccanismi di trasduzione del segnale, sono importanti nell'avviare la risposta immunitaria nei confronti di diversi patogeni, infatti difetti genetici a loro carico aumentano la suscettibilità verso specifiche classi di microrganismi.

TABELLA 47.1 Recettori e rispettivi PAMP

Recettore		Microrganismi in cui si trovano i PAMP
TLR	TLR2-1	Batteri
	TLR2-2	Batteri, micobatteri, candida, tripanosoma
	TLR2-6	Micoplasma, streptococco, <i>Saccharomyces</i>
	TLR3	Virus West Nile, reovirus
	TLR4	Batteri Gram-negativi, candida, virus respiratorio sinciziale
	TLR5	Batteri flagellati
	TLR7 e TLR8	Virus dell'influenza, virus della stomatite vescicolare
	TLR9	Virus herpes simplex, batteri e funghi a DNA
	CLR	
NLR	NOD1	Batteri Gram-negativi
	NOD2	Batteri Gram-positivi
	NLRP1	<i>Bacillus anthracis</i>
	NLRP3	Batteri, listeria, stafilococco
	NLRC4	Shigella, salmonella, legionella
	AIM2	<i>Francisella tularensis</i>
RIG-I helicase receptors	RIG-I	Paramyxovirus, ortomyxovirus, rabdovirus, flavivirus
	MDA5	Picornavirus, reovirus, flavivirus

membrana plasmatica determina la fuoriuscita di ioni, proteine e altre molecole;

- ▶ in caso di rottura della membrana basale, si creano delle interazioni tra mesenchima ed epitelio con conseguente avvio dei processi di riparazione;
- ▶ gli epitelii di superficie separano i compartimenti interni dall'ambiente esterno;
- ▶ il danno a carico dell'endotelio vascolare determina la fuoriuscita dal letto vascolare di proteine plasmatiche e piastrine che guadagnano lo spazio extravascolare.

Il fattore di Hageman (o fattore XII), un fattore plasmatico regolatore dell'infiammazione, viene attivato dal contatto con il collagene e altri componenti della matrice extracellulare. Questo fattore, una volta attivato, agisce come sensore del danno vascolare e innesca le quattro cascate proteolitiche che generano i mediatori dell'infiammazione: la cascata callicreina-chinina, la cascata della coagulazione, la cascata fibrinolitica e la cascata del complemento. Anche le piastrine sono attivate dal contatto con il collagene e producono diversi mediatori dell'infiammazione, come trombossani e serotonina.

Infiammazione cronica è prodotta da cristalli, AGEs e lipoproteine ossidate

Gli induttori endogeni finora discussi sono coinvolti nella risposta infiammatoria acuta, mentre un'altra classe di induttori è maggiormente coinvolta nell'infiammazione cronica e comprende cristalli di urato monosodico, calcio pirofosfato diidrato, AGEs (*Advanced Glycation End products*) e lipoproteine ossidate.

La formazione dei cristalli è facilitata in alcuni tessuti connettivi che forniscono una superficie adeguata per la loro nucleazione. La formazione di cristalli di urato monosodico e calcio pirofosfato diidrato nelle articolazioni e nei tessuti periarticolari, ad esempio, è responsabile di condizioni infiammatorie note rispettivamente come gotta e pseudogotta. Questi cristalli, quando raggiungono determinate dimensioni, sono rilevati dai macrofagi e sostanzialmente trattati come corpi estranei. La fagocitosi di queste particelle scatena l'attivazione dell'inflammosoma NALP3 e in seguito la produzione di substrati della caspasi-1, come i componenti della famiglia dell'interleukina-1 (IL-1). Gli AGEs sono prodotti della glicazione

non enzimatica di proteine a lunga vita come il collagene. Questi prodotti possono risultare nel crosslinking di proteine cui sono legati favorendo il graduale deterioramento della loro funzione. Inoltre, gli AGEs sono riconosciuti dai recettori RAGE, che possiedono un'attività infiammatoria. Gli AGEs si possono accumulare in condizioni di iperglicemia e pro-ossidative, come nel caso del diabete di tipo 1 e 2 e con l'invecchiamento.

Le specie reattive dell'ossigeno, prodotte dai macrofagi, sono implicate nella conversione delle lipoproteine ad alta e bassa densità (HDL e LDL) in segnali infiammatori mediante ossidazione delle loro componenti lipidiche e proteiche.

Un altro gruppo di induttori endogeni dell'infiammazione è rappresentato dai prodotti di degradazione della matrice extracellulare generati in caso di danno o disfunzione tissutale. Il componente meglio caratterizzato della matrice in questo contesto è il glicosaminoglicano ialuronato. In condizioni normali, lo ialuronato è presente come un polimero inerte a elevato peso molecolare. Il danno tissutale promuove la sua rottura in frammenti a peso molecolare più basso e con attività infiammatoria, che attivano TLR4 e promuovono la risposta di riparazione tissutale. Si ritiene che questa conversione sia anche ROS-dipendente. Diversi pathway endogeni che avviano la risposta infiammatoria dipendono dalle specie reattive dell'ossigeno.

L'elenco degli induttori endogeni dell'infiammazione è in continua crescita, anche se non tutti sono sufficientemente caratterizzati, a volte per difficoltà tecniche (ad esempio, un'identificazione errata può derivare dalla contaminazione di proteine ricombinanti con tracce di ligandi microbici).

Molti induttori endogeni dell'infiammazione esercitano probabilmente un'adeguata attività in vivo solo se presenti in determinate combinazioni e forse solo in un contesto di disfunzione o di danno tissutale. Ad esempio, ischemia e ipossia, aumentate concentrazioni di ROS e componenti alterati della matrice extracellulare sono di solito associati al danno o alla disfunzione tissutale, ma non sono riprodotti nelle colture tissutali, che di solito contengono concentrazioni sovra-fisiologiche di nutrienti e ossigeno. Inoltre, è probabile che esista un'altra classe di induttori, al momento non identificata, che scatena la risposta infiammatoria nei tessuti malfunzionanti o sotto stress. Questi segnali si riferiscono all'omeostasi dei tessuti e inducono una risposta adattativa che coinvolge alcune componenti della risposta infiammatoria classica.

Mediatori ed effettori dell'infiammazione

Gli induttori dell'infiammazione innescano la produzione di numerosi mediatori che a loro volta alterano la funzionalità di diversi organi e tessuti

Molti dei mediatori dell'infiammazione hanno effetti comuni sulla rete vascolare e sul reclutamento leucocitario. Questi mediatori possono derivare dalle proteine plasmatiche o essere secreti dalle cellule. I mediatori

cellulari possono essere prodotti da leucociti specializzati (soprattutto macrofagi residenti e mastcellule) o da cellule presenti nei tessuti locali. Alcuni mediatori (come istamina e serotonina) sono precostituiti e depositati in granuli all'interno di mastcellule, basofili e piastrine. Altri circolano come precursori inattivi nel plasma.

La concentrazione plasmatica di questi mediatori può aumentare marcatamente a seguito dell'aumentata secrezione di precursori da parte degli epatociti durante la risposta di fase acuta. Altri mediatori sono prodotti direttamente in risposta a una stimolazione appropriata da parte degli induttori dell'infiammazione.

I mediatori dell'infiammazione possono essere classificati in 7 gruppi in base alle loro proprietà biochimiche: ammine vasoattive, peptidi, frammenti del complemento, mediatori lipidici, citochine, chemochine ed enzimi proteolitici.

- Le *ammine vasoattive* (istamina e serotonina) sono prodotte a seguito della degranulazione di mastcellule e piastrine. Esse hanno effetti complessi sulla rete vascolare, causando un'aumentata permeabilità vascolare e vasodilatazione o vasocostrizione a seconda del contesto. Le conseguenze immediate del loro rilascio dalle mastcellule può essere altamente nocivo negli organismi sensibilizzati, determinando un collasso circolatorio e respiratorio durante lo shock anafilattico.

- I *peptidi vasoattivi* possono essere immagazzinati in forma attiva nelle vescicole secretorie (ad esempio, sostanza P) o prodotti dalla degradazione di precursori inattivi nel fluido extracellulare (ad esempio, chinine, fibrinopeptide A, fibrinopeptide B e prodotti della degradazione della fibrina). La sostanza P è rilasciata dai neuroni sensitivi e può essa stessa causare la degranulazione delle mastcellule. Altri peptidi vasoattivi derivano dalla proteolisi mediante fattore di Hageman, trombina o plasmina e causano vasodilatazione e aumento della permeabilità vascolare (direttamente o indirettamente inducendo il rilascio di istamina dalle mastcellule). Il fattore di Hageman gioca un ruolo chiave nel coordinare queste risposte e agisce sia come sensore di danno vascolare che come induttore dell'infiammazione. Esso attiva la cascata della callicreina-chinina e il principale prodotto di questa cascata, la bradichinina, influenza la rete vascolare e ha un potente effetto algogeno (il dolore ha un importante ruolo fisiologico nell'infiammazione perché avverte l'organismo dell'esistenza di un danno tissutale).

- I *frammenti del complemento* C3a, C4a e C5a (o anafilatossine) sono prodotte da diversi pathway dell'attivazione del complemento; C5a (e in minor misura C3a e C4a) promuove il reclutamento di granulociti e monociti e induce la degranulazione delle mastcellule, coinvolgendo la rete vascolare.

- I *mediatori lipidici* (eicosanoidi e *platelet-activating factors*) derivano dai fosfolipidi, come la fosfatidilcolina che è presente sul versante interno della membrana cellulare. Dopo attivazione da parte del calcio intracellulare, la fosfolipasi A2 citosolica genera acido arachidonico e acido lisofosfatidico, precursori delle due classi di mediatori lipidici dalla fosfatidilcolina.

L'acido arachidonico è metabolizzato a eicosanodi dalle ciclo ossigenasi (COX1 e COX2), che producono prostaglandine e trombossani, o dalla lipossigenasi che produce leucotrieni e lipossine. Le prostaglandine PGE2 e PGI2 causano vasodilatazione; la PGE2 è anche algogena e un potente piretico. Le lipossine (e i derivati degli acidi grassi ω 3 alimentari, resolvine e protectine) inibiscono l'infiammazione e promuovono la risoluzione della flogosi e la riparazione tissutale. I *platelet-activating factors* sono prodotti dall'acetilazione dell'acido lisofosfatidico e attivano diversi processi che si verificano nella risposta infiammatoria, come il reclutamento dei leucociti, la vasodilatazione e la vasocostrizione, l'aumento della permeabilità plasmatica e l'attivazione piastrinica.

- ▶ Le *citochine infiammatorie* (ad esempio, *Tumor-Necrosis Factor* (TNF) α , IL-1, IL-6) sono prodotte da diversi tipi cellulari, in particolare da macrofagi e mastcellule. Diverse sono le loro attività nell'ambito della risposta infiammatoria, come attivazione dell'endotelio e dei leucociti e induzione della risposta di fase acuta.
- ▶ Le *chemochine* sono prodotte da diversi tipi cellulari in risposta agli induttori dell'infiammazione. Esse controllano lo stravasamento dei leucociti e la chemiotassi verso i tessuti danneggiati.
- ▶ Gli *enzimi proteolitici* (ad esempio, elastina, cathepsine e metallo proteinasi della matrice) hanno diversi ruoli nell'infiammazione, in parte degradando la matrice extracellulare e le proteine della membrana basale. Queste proteasi sono coinvolte in diversi processi, come la difesa dell'ospite, il rimodellamento tissutale e la migrazione leucocitaria.

Comunque, non è chiaro quanto la natura di uno stimolo flogistico determini il tipo di mediatore indotto. Inoltre, molti mediatori non hanno solo effetti diretti sui tessuti bersaglio, ma possono indurre la produzione di ulteriori mediatori.

Gli *effettori* di una risposta infiammatoria sono i tessuti e le cellule, lo stato funzionale dei quali è specificamente alterato dai mediatori dell'infiammazione. La responsabilità ad alcuni mediatori (come TNF- α e IL-1) è quasi ubiquitaria, sebbene essi abbiano effetti distinti in diversi tessuti e cellule. Anche se l'effetto più ovvio dei mediatori dell'infiammazione è quello di indurre la formazione di un essudato (mediante l'azione sulla rete vascolare e sulla migrazione leucocitaria), molti hanno anche altri importanti effetti sulle funzioni neuroendocrine e metaboliche e sul mantenimento dell'omeostasi tissutale. Queste funzioni dei mediatori dell'infiammazione riflettono un ruolo più generale per l'infiammazione nel controllo dell'omeostasi tissutale e nell'adattamento a situazioni di danno.

L'infiammazione acuta e quella cronica sono differenti risposte adattative chiamate in causa quando altri meccanismi omeostatici sono insufficienti o non adeguati

I meccanismi di controllo omeostatico assicurano che i parametri dell'ambiente interno (come concentrazioni

di glucosio e ossigeno) siano mantenuti entro limiti accettabili. Condizioni anomale possono causare una deviazione di alcuni parametri portando a una risposta acuta allo stress che consente un momentaneo adattamento alle nuove condizioni o a una modifica adattativa più sostenuta che determina uno spostamento dei set point dei parametri interessati. Si ritiene di solito che la risposta infiammatoria agisca in caso di gravi alterazioni dell'omeostasi, come infezioni, danno tissutale e presenza di corpi estranei o irritanti. Tuttavia, la gamma di condizioni in grado di scatenare l'infiammazione è molto più vasta, rappresentando infezioni e lesioni gli stimoli che inducono risposte più corpose. Più in generale, una risposta infiammatoria è presumibilmente avviata quando viene riscontrata una disfunzione del tessuto. Questi tipi di risposta infiammatoria sono più comuni, ma di minore intensità rispetto alla classica risposta infiammatoria indotta da infezioni o lesioni. La natura e il grado della disfunzione tissutale influenzeranno la "tracciabilità" della risposta infiammatoria mediante i comuni biomarker.

Alcune alterazioni tissutali possono variare da una lieve disfunzione tessuto-specifica a danni massivi e, di conseguenza, l'entità della risposta infiammatoria può differire marcatamente.

Uno stress molto lieve potrebbe essere affrontato dalle cellule residenziali (soprattutto macrofagi e mastcellule), mentre disfunzioni o danni più estesi potrebbero richiedere il reclutamento di ulteriori leucociti e il rilascio di proteine plasmatiche.

Questi ultimi effetti sono tipici della risposta infiammatoria. A differenza dei segnali relativi a infezioni e lesioni, i segnali indicativi di stress e disfunzione tissutale, e i sensori molecolari che li rilevano, sono in larga parte sconosciuti.

Qualunque ne sia la causa, lo scopo della risposta infiammatoria è quello di rimuovere o sequestrare la fonte del danno, favorire l'adattamento alla nuova condizione e ripristinare funzionalità e omeostasi del tessuto

Se le alterazioni sono transitorie, un'efficace risposta infiammatoria acuta permette il ritorno del sistema alle condizioni basali. Se invece le alterazioni si protraggono, lo stato infiammatorio continuo determina un riassetto del sistema con set point diversi, come si verifica in caso di infiammazione cronica.

Una modifica adattativa spesso fornisce dei benefici a breve termine, ma nel cronico l'adattamento può venire meno.

Ad esempio, una riduzione transitoria della sensibilità all'insulina in caso di infiammazione acuta potrebbe portare a una ridistribuzione del glucosio da parte dei tessuti che ne consumano maggiormente (come ad esempio il muscolo scheletrico) a favore di leucociti e altre cellule che devono affrontare un maggiore fabbisogno energetico in caso di infezione e riparazione tissutale. Tuttavia, una persistente resistenza insulinica da parte del muscolo scheletrico può portare a diabete di tipo 2.

Altro esempio può essere la metaplasia squamosa che, nel breve termine, protegge il tratto respiratorio dall'azione lesiva degli agenti irritanti, ma nel lungo termine determina un declino della funzione respiratoria.

Le modifiche adattative inducibili, inoltre, si verificano in genere a spese di altri processi fisiologici. Ad esempio, la risposta di fase acuta e l'edema hanno una valenza adattativa durante le infezioni batteriche, ma si verificano a discapito del normale funzionamento di molti tessuti. Il marcato incremento della concentrazione delle proteine plasmatiche durante la risposta di fase acuta altera la pressione oncotica, con potenziali effetti avversi sul sistema circolatorio, mentre l'edema causa una ipossia locale, aumentando la distanza tra cellule parenchimali e capillari.

■ Ogni disfunzione tissutale è innescata da modifiche degli stati cellulari

Ogni cellula può presentare quattro possibili stati: basale, stressato, apoptotico o necrotico. Una cellula si trova allo stato basale in condizioni normali e questo stato è mantenuto dalla disponibilità di nutrienti, ossigeno e fattori di crescita e dall'adesione ad altre cellule e/o alla matrice extracellulare.

Una modifica dei parametri ambientali interni (temperatura, osmolarità, ossigeno ecc.) induce una risposta adattativa della cellula a una condizione anomala. Se la modifica di un parametro supera le capacità di risposta della cellula, allora viene indotta l'apoptosi.

L'apoptosi controllata si verifica per motivi non correlati al mantenimento del tessuto. Ognuno dei quattro stati cellulari è regolato da pathway di segnali specializzati. Recenti evidenze indicano che anche la necrosi, in precedenza considerata una forma di morte cellulare accidentale e non pianificata, è regolata da programmi genetici dedicati.

I pathway che inducono o mantengono ogni stato sono collegati in modo da inibire la transizione allo stato successivo. Quindi, lo stato cellulare più favorevole (in ordine decrescente: basale, stressato, apoptotico e necrotico) inibisce la transizione allo stato successivo, meno favorevole, fino a quando questa transizione non sarà inevitabile.

Questa dinamica ha due importanti implicazioni:

1. assicura che la transizione avvenga più come uno switch che gradualmente; questo è importante perché permette alle cellule di esaurire tutti i tentativi per restare in uno stato più congeniale prima di passare a uno stato meno favorevole;
2. ogni stato cellulare può esprimere diversi set di segnali indicativi dello stato stesso e la modalità di transizione impedisce la generazione di messaggi misti.

■ Il ruolo dei macrofagi nell'infiammazione

Si ritiene che lo stato delle cellule e dei tessuti sia monitorato soprattutto dai macrofagi residenti (e in alcuni tessuti anche dalle mastcellule). Quando i tessuti sono allo stato basale, i macrofagi tissutali mantengono l'omeostasi con diversi meccanismi tessuto-specifici. I macrofagi tissutali costituiscono il 10-15% della maggior parte dei tessuti e le loro funzioni comprendono la difesa

e la rimozione delle cellule apoptotiche (ad esempio, controllo del turnover di cellule epiteliali, regolazione dell'attività metabolica degli adipociti, rimodellamento dell'osso eseguito dagli osteoclasti). Quando i tessuti sono in condizioni di stress o non funzionano adeguatamente per altri motivi, essi possono inviare ai macrofagi tissutali segnali diversi da quelli inviati allo stato basale. I macrofagi tissutali rispondono producendo maggiore quantità o differenti tipi di fattori di crescita e altri segnali che sono importanti per quel particolare tessuto.

In condizioni estreme, l'aiuto fornito dai macrofagi locali potrebbe essere insufficiente, e i tessuti potrebbero avere la necessità di richiamare ulteriori macrofagi. Ad esempio:

- ▶ adipociti mal funzionanti in animali obesi secernono il *Chemokine CC-Chemokine Ligand 2 (CCL2)*, che richiama molti più macrofagi verso il tessuto adiposo;
- ▶ i tessuti ipossici producono il *Chemokine CXC-Chemokine Ligand 12 (CXCL12)*, anch'esso capace di reclutare macrofagi.

I segnali di origine tissutale possono controllare l'attivazione dello stato e del tipo di macrofagi reclutati. Lo scopo principale di queste interazioni è quello di aiutare i tessuti ad adattarsi a condizioni stressanti e a ripristinare la loro funzionalità.

Tuttavia, quando queste interazioni sono protratte o eccessive possono diventare disadattative, come quando i macrofagi contribuiscono allo sviluppo di resistenza all'insulina nel tessuto adiposo.

Inoltre, la funzione accessoria dei macrofagi (assistere l'adattamento dei tessuti a condizioni di stress) può essere sfruttata dalle cellule tumorali che li reclutano e li usano come fonte di fattori di crescita, fattori angiogenici e chemochine, sfruttamento cruciale nella progressione dei tumori e nello sviluppo di metastasi.

Se la disfunzione tissutale o lo stress sono eccessivi e l'adattamento non è possibile per lungo tempo, le cellule muoiono per apoptosi o necrosi. Infezioni e lesioni tissutali contribuiscono di solito a questa transizione, ma anche altri insulti possono avere questo effetto. In caso di infiammazione, la morte cellulare è monitorata e presieduta dai macrofagi. Oltre a rimuovere le cellule apoptotiche e necrotiche, i macrofagi possono prendere anche altre decisioni, che vanno dalla rimozione silente delle cellule morte all'induzione di una risposta infiammatoria. Poiché la necrosi cellulare è solitamente associata a danno tissutale, l'outcome dell'intervento dei macrofagi è la risposta infiammatoria, mentre l'apoptosi, potendo verificarsi per diversi motivi, richiede la capacità da parte dei macrofagi di decifrare la causa della morte in modo da prendere la decisione più appropriata.

■ Diversi tipi di apoptosi hanno conseguenze differenti

- ▶ Durante l'apoptosi programmata, le cellule morte sono rimosse dai macrofagi senza ulteriori conseguenze; poiché questo tipo di apoptosi è parte integrante dell'evoluzione o del turnover cellulare, i macrofagi possono produrre fattori di crescita che promuovono la proliferazione cellulare per rimpiazzare le cellule morte.



FIGURA 47.3 Risposte diverse a differenti processi che inducono la morte cellulare o patologiche.

- ▶ L'apoptosi indotta da lesione o stress eccessivo porta a una perdita cellulare non programmata che deve essere compensata dalla formazione di nuove cellule dello stesso tipo; quindi i macrofagi dovrebbero indurre una risposta di riparazione del tessuto.
- ▶ L'apoptosi indotta dall'infezione stimola una risposta difensiva da parte dei macrofagi di tipo immunitario.
- ▶ L'apoptosi indotta dall'infiammazione o da risposte immunitarie dovrebbe avere l'effetto opposto a quella indotta dall'infezione, risultando in una risposta anti-infiammatoria e immunosoppressiva.

I macrofagi riconoscono tutte le cellule apoptotiche (indipendentemente da come l'apoptosi sia stata indotta) rilevando la fosfatidilserina sulla superficie di queste cellule. Gli outcome delle varie forme di apoptosi sono probabilmente determinati da segnali aggiuntivi, prodotti dalle cellule morte per diverse cause (Figura 47.3).

L'adattamento e il mantenimento dell'omeostasi dipendono dalla gravità della lesione

I tessuti possono contenere un numero variabile di cellule morte o presentare diversi gradi di disfunzione. Di conseguenza, la risposta adattativa stimolata dai tessuti può prendere diverse forme in base al grado del problema che si sta verificando.

Quindi, in condizioni basali, i tessuti sono mantenuti in condizioni omeostatiche, in molti casi con l'aiuto dei macrofagi tissutali.

In condizioni patologiche, i tessuti sono sottoposti a stress e possono non funzionare adeguatamente. Se le modifiche sono considerevoli, l'adattamento alla nuova situazione richiede l'aiuto di macrofagi tissutali o di macrofagi reclutati, fino ad arrivare anche alla liberazione di ulteriori leucociti e proteine plasmatiche, in base all'entità del problema. Questa risposta adattativa ha caratteristiche intermedie tra lo stato basale e quello infiammatorio e potrebbe essere definita come *para-infiammazione*. Le risposte para-infiammatorie procedono per gradi variando dallo stato più vicino a quello basale fino all'inizio della transizione a infiammazione (Figura 47.4). L'induzione di una risposta para-infiammatoria non necessita di un danno o di un'infezione evidente ed

è innescata dalla disfunzione tissutale per ripristinare la normale funzionalità tissutale e l'omeostasi. Se la disfunzione si protrae nel tempo, la para-infiammazione può diventare cronica. Una disfunzione prolungata può derivare da mutazioni, fattori ambientali o caratteristiche mal adattative responsabili di nuove malattie umane.

Infatti, molte malattie infiammatorie croniche non causate da infezioni o lesioni sembrano essere associate a condizioni non presenti durante la prima evoluzione degli esseri umani, come la continua disponibilità di nutrienti a elevato contenuto calorico, un basso livello di attività fisica, l'esposizione a composti tossici e l'età avanzata. Le malattie umane associate a queste condizioni, come obesità, diabete di tipo 2, aterosclerosi, asma e malattie neurodegenerative, sono tutte caratterizzate da un'infiammazione cronica di basso grado (para-infiammazione), che potrebbe non avere un corrispettivo fisiologico.

Inoltre, la para-infiammazione cronica che persiste in queste condizioni può a sua volta contribuire a un'ulteriore progressione di malattia, in parte a causa delle modifiche dei set point omeostatici (come la sensibilità all'insulina o la pressione arteriosa).

Strategie farmacologiche per il trattamento dell'infiammazione

L'infiammazione è stata e continua a essere oggetto di studio per illuminare le zone d'ombra ancora presenti al fine di una sua migliore comprensione e gestione.

I farmaci per il trattamento dell'infiammazione sono molteplici e possono interessare varie tappe del processo flogistico. I glucocorticoidi e i farmaci antinfiammatori non steroidei rappresentano le pietre miliari di questo trattamento (vedi Capitoli 44 e 45).

Oggi la ricerca tende ad affinare le strategie terapeutiche, puntando l'attenzione su farmaci che mirino a target più selettivi.

Ad esempio, alcuni anticorpi monoclonali (anticorpi prodotti da un clone cellulare originato da un singolo linfocita B, capace di riconoscere uno specifico antigene) sono impiegati nel trattamento di malattie su base immunitaria, come l'artrite reumatoide.

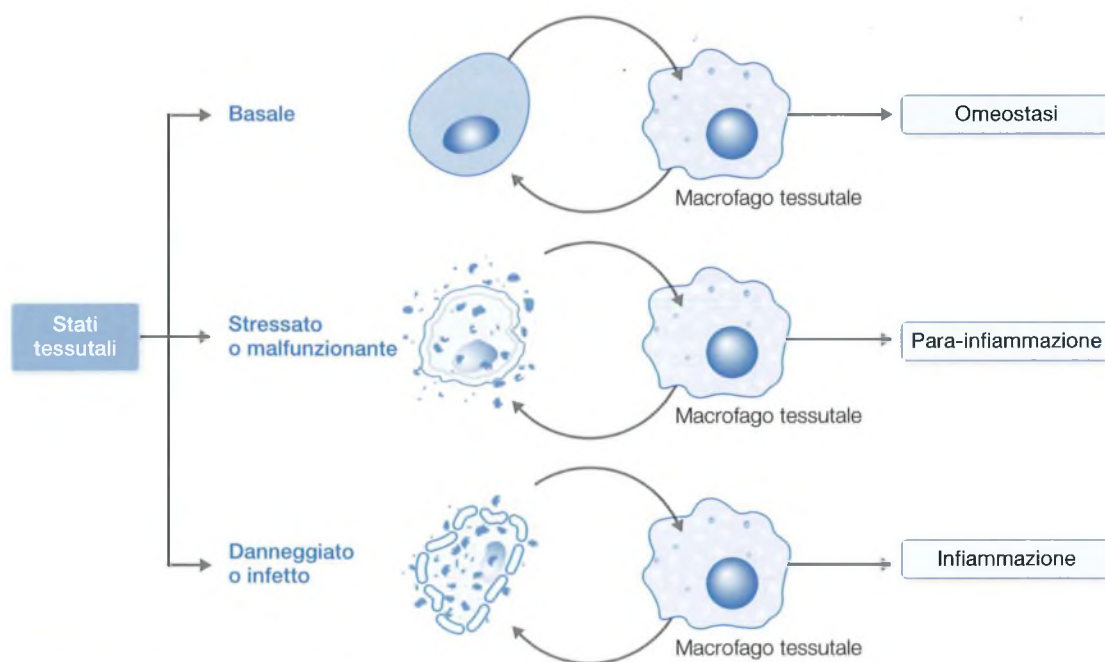


FIGURA 47.4 Adattamento e mantenimento dell'omeostasi in diverse condizioni fisiologiche e patologiche.

Essi possono agire in vari modi, mediante:

- ▶ blocco del ligando (con anticorpi IgG completi, frammenti di anticorpi o immunoadesine al recettore) per evitare che si leghi al suo recettore;
- ▶ blocco dell'attivazione o della funzione del recettore;
- ▶ internalizzazione e down-regulation del recettore per limitarne la presenza sulla superficie cellulare;
- ▶ deplezione di cellule presentanti l'antigene;
- ▶ induzione di segnali attivi che alterano i processi cellulari successivi all'interazione ligando-recettore.

Se da un lato questi farmaci consentono di agire selettivamente su specifiche molecole (ad esempio, citochine, recettori ecc.) direttamente coinvolte nella patogenesi di molte malattie, dall'altro è necessario non dimenticare che, proprio in virtù della complessità dei processi coinvolti (in parte ancora sconosciuti), il profilo rischio/beneficio di questi farmaci deve essere ancora ben caratterizzato, soprattutto in caso di impieghi a lungo termine, come quelli previsti per le malattie autoimmuni.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'infiammazione è una risposta adattativa scatenata da stimoli e condizioni irritative, sottesa da eventi cellulari e molecolari, in larga parte noti per quanto concerne gli eventi acuti, meno per gli eventi cronici.
- ▶ Una risposta infiammatoria controllata è generalmente considerata utile, mentre diventa dannosa se disregolata.
- ▶ Independentemente dalla causa, l'infiammazione tende a evolvere come una risposta adattativa, nel tentativo di ristabilire l'omeostasi.
- ▶ La risposta infiammatoria è coordinata da diversi mediatori che formano complesse reti di regolazione.
- ▶ I farmaci per il trattamento dell'infiammazione sono molteplici e possono interessare varie tappe del processo flogistico.

Bibliografia essenziale

- ▶ Bensinger SJ, Tontonoz B. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 2008;454:470-7.
- ▶ Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010;10:301-16.
- ▶ Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008;454:445-54.
- ▶ Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. *Nature* 2008;454:463-9.
- ▶ Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436-44.
- ▶ Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454:428-35.
- ▶ Netea MG, van der Meer J. Immunodeficiency and Genetic Defects of Pattern-Recognition Receptors. *N Engl J Med* 2011;364:60-70.
- ▶ Strowing T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 2012;481:278-86.
- ▶ Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008;454:455-62.

Personalizzazione della terapia

CAPITOLO 48

Evoluzione dello studio della farmacocinetica nel processo di scoperta di nuovi farmaci

Simone Braggio, Mario Pellegatti

CAPITOLO 49

Basi cellulari della farmacocinetica

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

CAPITOLO 50

Assorbimento e vie di somministrazione dei farmaci

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

CAPITOLO 51

Distribuzione ed eliminazione dei farmaci

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

CAPITOLO 52

Il metabolismo dei farmaci

Enzo Chiesara, Laura Marabini, Sonia Radice

CAPITOLO 53

Controllo della concentrazione plasmatica dei farmaci

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

CAPITOLO 54

Farmacogenetica e personalizzazione della terapia

Diego Fornasari

CAPITOLO 55

Interazioni tra farmaci

Achille P. Caputi, Giuseppina Fava, Angela De Sarro

12

Evoluzione dello studio della farmacocinetica nel processo di scoperta di nuovi farmaci

CAPITOLO

48

Simone Braggio, Mario Pellegatti

Obiettivi formativi

- Comprendere l'evoluzione che la farmacocinetica, intesa come vera e propria disciplina, ha avuto negli ultimi due decenni
- Comprendere il ruolo che la farmacocinetica ha nel tradurre le informazioni di farmacologia generale e molecolare (in vitro) in un effetto farmacologico nel paziente (in vivo)
- Acquisire nozioni sull'influenza che la farmacocinetica, in quanto scienza applicata, ha nell'intero processo di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci

Negli ultimi due decenni gli studi di farmacocinetica e metabolismo hanno assunto un ruolo centrale per la selezione di molecole efficaci e nella loro successiva caratterizzazione. La farmacocinetica studia e descrive che cosa succede al farmaco una volta introdotto nell'organismo. Fino agli anni 80 gli studi di farmacocinetica venivano effettuati esclusivamente in fase di sviluppo avanzato e con finalità registrative, avevano cioè soprattutto uno scopo descrittivo e ci si proponeva di conoscere le caratteristiche farmacocinetiche (livelli plasmatici nel tempo, distribuzione tissutale negli animali, identificazione dei principali metaboliti) di un farmaco già scelto, senza praticamente alcuna possibilità di migliorarle nel caso non fossero ottimali. L'obiettivo era di raccogliere informazioni necessarie a ridurre rischi nell'uso clinico (anticipare il rischio di interazioni con altri farmaci, ottimizzare l'intervallo tra le dosi), oppure studiare nuove formulazioni. Questa strategia ha causato tuttavia un'alta percentuale di fallimenti con molte molecole che non completavano lo sviluppo proprio a causa di una farmacocinetica non ottimale (basso assorbimento o biodisponibilità, emivita corta, alta variabilità interindividuale, interazioni pericolose con altri farmaci).

Gli insuccessi hanno portato ad anticipare gli studi di farmacocinetica e sono stati adottati numerosi saggi in vitro e in vivo che consentono, con ottima approssimazione, di prevedere le caratteristiche farmacocinetiche nell'uomo. Va rilevato che questa strategia ha dato i suoi frutti e che oggi è meno frequente che siano le caratteristiche farmacocinetiche a determinare il mancato sviluppo di una nuova molecola.

In parallelo è anche aumentato l'interesse per lo studio

dei metaboliti e del loro contributo all'attività farmacologica e alla tossicità. Si parla sempre infatti di "farmacocinetica e metabolismo" o, con un acronimo inglese, di DMPK (*Drug Metabolism and Pharmacokinetics*).

Nella figura 48.1 viene riportato il "cammino" che un farmaco compie dalle prime fasi sperimentali al suo uso esteso nell'uomo, integrato con gli interventi che mirano a una definizione farmacocinetica e metabolica del composto. Si noti come alcuni di questi interventi avvengono già precocemente durante le fasi precliniche di studio e come altri siano introdotti o continuino quando il farmaco è già in uso nell'uomo.

Ruolo della farmacocinetica nella scoperta di nuovi farmaci

Una ottimale esposizione di un farmaco nell'organismo è cruciale per espletare il suo effetto farmacologico. Efficacia, tossicità e farmacocinetica sono strettamente intercorrelate e non possono essere discusse, valutate e interpretate separatamente. Ad esempio, l'eccessiva tossicità di un potenziale farmaco potrebbe essere dovuta a una troppo lenta eliminazione dall'organismo, o alla formazione di metaboliti reattivi. Allo stesso modo un farmaco potrebbe essere scartato perché poco efficace, ma la reale causa potrebbe essere una non ottimale farmacocinetica dovuta a un eccessivo metabolismo del farmaco, legato ad esempio a fenomeni di induzione degli enzimi metabolizzanti, oppure a una insufficiente concentrazione del farmaco al sito di azione (biofase) dovuta a un legame troppo elevato alle proteine plasmatiche.

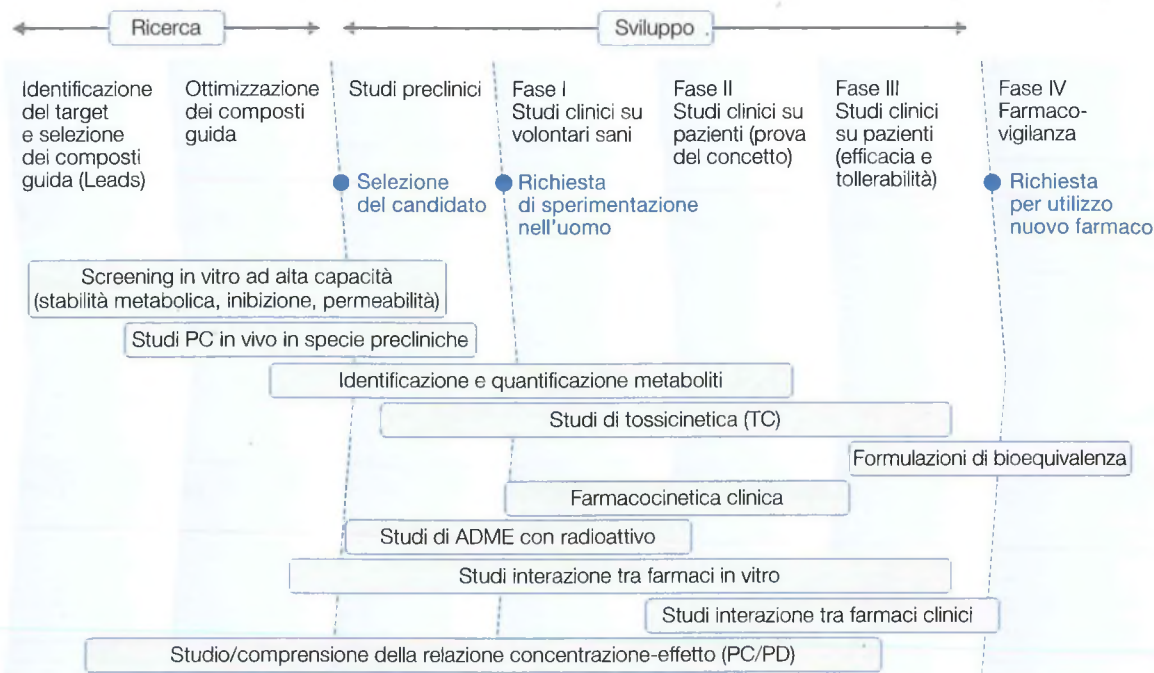


FIGURA 48.1 Ruolo della farmacocinetica nelle fasi di ricerca e sviluppo di un nuovo farmaco. PC: farmacocinetica; PD: farmacodinamica; TC: tossicocinetica.

Idealmente un candidato farmaco deve essere in grado di essere assorbito, raggiungere il sito d'azione e rimanervi per un tempo sufficiente per espletare il suo effetto per poi essere eliminato senza produrre effetti tossici. Ogni classe terapeutica richiede caratteristiche farmacocinetiche specifiche. Ad esempio, un anestetico deve essere eliminato dall'organismo abbastanza velocemente; al contrario un antinfiammatorio deve essere eliminato molto più lentamente; un antibatterico o un antivirale devono avere concentrazioni che raggiungono e superano i livelli inibenti la crescita dei microrganismi. Gli approcci e le metodologie usate per lo studio delle caratteristiche di DMPK variano notevolmente a seconda della fase del processo di ricerca in cui ci si trova. Nella fase precoce, cioè nella fase in cui con modificazioni chimiche della struttura si cerca di ottimizzare le caratteristiche del potenziale farmaco, lo scopo principale è quello di selezionare tra un numero consistente di entità chimiche la molecola con le migliori caratteristiche per poter essere sviluppata. In questo contesto le tecnologie e le metodologie di DMPK utilizzate dovranno avere caratteristiche di alta capacità e velocità (HT, *High Throughput*). Viceversa nella fase di sviluppo gli studi di DMPK vengono condotti con l'obiettivo di definire le caratteristiche di farmacocinetica e metabolismo del candidato farmaco con lo scopo di soddisfare le richieste provenienti dalle varie autorità regolatorie, di capire come utilizzare al meglio il prodotto stesso (ad esempio, intervenendo sulla formulazione o sulla posologia) e di prevenire potenziali rischi, quali interazioni con altri farmaci.

Farmacocinetica e metabolismo nelle prime fasi di ricerca

In passato gli studi volti a studiare la farmacocinetica di un nuovo farmaco cominciavano solamente nella fase di sviluppo, ma gli studi fondamentali condotti verso la fine degli anni 80 hanno evidenziato che le cause principali di fallimento dei farmaci candidati durante il processo di sviluppo erano le inadeguate proprietà biofarmaceutiche (ad esempio, farmacocinetica e biodisponibilità) o di sicurezza. Una delle prime contromisure è stata quella di introdurre anche nella fase iniziale del processo di ricerca i tradizionali studi di sviluppo su metabolismo e farmacocinetica (Tabella 48.1). Ciò ha richiesto la rapida esecuzione di grandi quantità di esperimenti di farmacocinetica e tossicità (chiamati con l'acronimo ADMET: Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Escrezione e Tossicità), mantenendo al contempo l'elevato livello qualitativo dei dati.

La comparsa di tecnologie analitiche come la cromatografia liquida collegata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS, *Liquid Chromatography and Mass Spectrometry*), la miniaturizzazione dei volumi e l'automazione delle procedure hanno consentito di raggiungere i livelli di produttività richiesti dalle moderne esigenze industriali (vedi **CD**: Approfondimento 48.1. *Bioanalitica come pietra angolare della farmacocinetica: la spettrometria di massa*). L'attuale processo di ricerca include ormai routinariamente la caratterizzazione in vitro e in vivo delle proprietà ADMET di centinaia di composti all'interno di uno stesso progetto di ricerca.

Parametri chimico-fisici e caratteristiche farmacocinetiche

La valutazione della relazione tra struttura e proprietà farmacocinetiche di un rilevante numero di molecole, negli ultimi anni, ha permesso di capire la portata che gli effetti delle proprietà chimico-fisiche possono avere sul successo di un farmaco e di identificare alcune caratteristiche chimico-fisiche essenziali che in qualche modo devono rimanere all'interno di certi confini.

Dall'analisi empirica di un'enorme quantità di dati, Christopher Lipinski nel 1997 ha estratto quella che oggi viene chiamata "Regola di Lipinski" o "Regola del 5".

La regola si basa su quattro semplici fondamenti:

- le molecole non devono avere una massa molecolare maggiore di 500 ($PM < 500$): infatti se le molecole fossero troppo voluminose e pesanti sarebbero difficilmente assimilabili e incontrerebbero troppa difficoltà nel processo di diffusione;
- non ci devono essere più di 5 donatori di ponti idrogeno: troppi ponti idrogeno rendono la molecola eccessivamente polare, impedendone la diffusione nelle parti lipofile;
- non ci devono essere più di 10 accettori di ponti idrogeno (di solito atomi di ossigeno o azoto);
- la molecola deve avere un $\log P$ (il logaritmo del coefficiente di ripartizione) minore di 5 ($\log P < 5$).

Se più di uno dei quattro principi viene violato la probabilità che la molecola abbia le necessarie caratteristiche diminuisce e, di conseguenza, diminuisce la probabilità che quella determinata molecola possa completare lo sviluppo e diventare un farmaco. La regola del 5 risulta così essere di grande interesse, estremamente efficace, semplice da ricordare, evidenziando solo due concetti: assorbimento (sarà meglio assorbita se di piccole dimensioni) e permeazione (attraverserà meglio le membrane se non sarà troppo idrofila).

Studi di permeabilità in vitro

La valutazione dell'assorbimento di un farmaco considera il percorso di una molecola dal sito di somministrazione al circolo sistemico. Il meccanismo di assorbimento determinerà l'insorgenza e la durata dell'effetto farmacologico, oltre al livello di esposizione sistemica. Per i farmaci a somministrazione orale, questo percorso passa attraverso le cellule dell'epitelio gastrointestinale e quindi

nel circolo enteroepatico. Come viene più ampiamente descritto nei Capitoli 49 e 50, la via predominante è costituita dalla diffusione passiva attraverso le cellule, benché rivestano un ruolo significativo anche la diffusione paracellulare attraverso le giunzioni strette fra le cellule e il trasporto attivo mediato da carrier.

L'assorbimento di un farmaco può essere inoltre limitato da trasportatori di efflusso, come la p-glicoproteina. Di conseguenza, l'assorbimento di un farmaco è un processo complicato, dipendente dalla solubilità e dalla permeabilità, dalle variabili della formulazione e da fattori fisiologici come le differenze regionali del pH gastrointestinale, della permeabilità e della motilità.

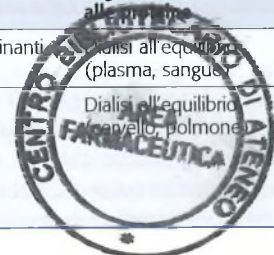
Numerose ricerche hanno documentato l'utilità dello screening basato sull'utilizzo delle colture cellulari e della loro predizione dell'effettivo assorbimento nell'uomo. In particolare le colture cellulari appaiono più predittive per quei composti che sono assorbiti prevalentemente da meccanismi trans-cellulari, mentre tendono a sotto-stimare l'assorbimento di composti che transitano per via para-cellulare a causa della ridotta dimensione dei pori tra le giunzioni intercellulari che generalmente si hanno in coltura. La linea cellulare di carcinoma del colon umano Caco-2 è considerata lo standard industriale per la valutazione in vitro della permeabilità e dei meccanismi di trasporto attivo attraverso l'epitelio intestinale e può essere facilmente impiegata in saggi HT. Per quanto riguarda le molecole largamente assorbite tramite diffusione passiva, esiste una buona correlazione fra il coefficiente di permeabilità apparente e la lipofilità (misurata sulla base del coefficiente di distribuzione fra solventi organici e acquosi).

Studi di stabilità metabolica in vitro

Come descritto nei Capitoli 51 e 52, la stabilità metabolica è un fattore cruciale che governa sia la biodisponibilità di un composto, sia la sua eliminazione dall'organismo. La stabilità all'ossidazione metabolica viene generalmente misurata con l'uso di microsomi epatici, generalmente di ratto, assieme a microsomi di origine umana, seguito, eventualmente, dall'esecuzione di studi specifici con altre specie pre-cliniche che hanno maggiore rilevanza per il composto in esame. I composti testati possono essere classificati in base alla loro stabilità metabolica in vitro, normalmente espressa come clearance intrinseca (Cl_i). Inoltre il confronto della stabilità metabolica in vitro tra

TABELLA 48.1 Principali saggi in vitro per la caratterizzazione ADMET dei composti nelle fasi precoci di ricerca

Caratteristiche chimico-fisiche	Permeabilità	Stabilità metabolica	Inibizione enzimi metabolizzanti	Legame all'albumina
Calcolo delle proprietà in silico	Membrane artificiali (PAMPA)	Microsomi epatici (varie specie/uomo)	Isoenzimi ricombinanti (CYP450)	Enzimi all'equilibrio (plasma, sangue)
Misurazioni tramite sistemi cromatografici	Monostrati cellulari (Caco-2, MDCK)	Epatociti (varie specie/uomo)	Microsomi epatici/epatociti	Dialisi all'equilibrio (polmone, cervello)
		Microsomi di altri tessuti (intestino, polmone, cervello, muscolo)		



specie pre-cliniche e l'uomo gioca un ruolo importante nella selezione delle specie animali da utilizzare negli studi di farmacocinetica e tossicità che seguiranno.

Studi di inibizione degli enzimi metabolizzanti in vitro

Come viene discusso nel Capitolo 55, svariati farmaci sono stati ritirati dal mercato a causa della loro tendenza a causare interazioni con altri farmaci (DDI, *Drug-Drug Interactions*) somministrati in contemporanea. Una delle maggiori cause di effetti di DDI risulta essere la competizione di più farmaci co-somministrati per lo stesso enzima. Uno dei principali siti di competizione sono gli isoenzimi specifici del citocromo P450 presenti nel fegato (vedi Capitolo 52). Se un farmaco inibisce il metabolismo di un secondo farmaco, allora quest'ultimo può accumularsi raggiungendo potenzialmente livelli tossici, o, viceversa, se stimola il metabolismo può inattivare più velocemente il secondo farmaco. Per questa ragione durante la fase di scoperta si procede allo screening per determinare se un composto è un potente inibitore di uno o più enzimi del citocromo P450. I test HT di inibizione del citocromo P450 sono spesso eseguiti usando un substrato "sonda" che emette fluorescenza quando viene metabolizzato. La co-incubazione della sonda e del composto da analizzare indica se quest'ultimo è in grado di inibire la produzione di fluorescenza a partire dal composto sonda. Analogamente al metodo di stabilità metabolica, il test è facilmente automatizzabile con le comuni piattaforme robotiche.

Studi di legame alle proteine in vitro

Come viene più ampiamente discusso nel Capitolo 51, la distribuzione del farmaco considera il movimento della sostanza dal circolo sistemico allo spazio extravascolare, che è spesso anche la sede del bersaglio terapeutico. Il processo di distribuzione del farmaco è in notevole misura una funzione della diffusione passiva e del legame alle proteine nel sangue e nei tessuti. Le molecole di farmaco che si trovano in forma legata a proteine hanno una distribuzione ristretta e sono quindi farmacologicamente inattive. La tecnica denominata dialisi all'equilibrio è il metodo più comunemente usato per valutare il legame dei farmaci alle proteine e quindi per stimarne l'effettiva concentrazione nella sede di attività farmacologica.

Come per i precedenti saggi, anche questa tecnologia è stata automatizzata e a oggi si eseguono valutazioni di legame alle proteine non solo plasmatiche, ma anche di svariati altri tessuti quali sangue, cervello, fegato, muscolo, polmone per decine o centinaia di composti in tempi brevi.

Studi preliminari di farmacocinetica in vivo

Nonostante il crescente numero di informazioni che oggi vengono ottenute tramite test in vitro, la complessità dei fenomeni coinvolti nei processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione rende la loro

estrapolazione farmacocinetica intricata e difficile. Di conseguenza, la determinazione della farmacocinetica in vivo dopo somministrazione in specie animali (generalmente ratto) è ancora un passaggio determinante. Anche se, dopo lo screening in vitro, il numero dei composti selezionati per l'esecuzione dei test di farmacocinetica in vivo si è notevolmente ridotto negli anni, decine di composti devono comunque essere dosati e analizzati. Nella fase precoce di ricerca tuttavia non è generalmente richiesto di ottenere profili farmacocinetici in vivo accurati che generalmente richiedono un'alta numerosità, ma piuttosto una valutazione che permetta di eliminare velocemente composti con proprietà farmacocinetiche non ottimali.

Uno dei protocolli sviluppati per aumentare la produttività degli studi di farmacocinetica in vivo è il dosaggio in cocktail (noto come "cassette dosing" o "n-in-one") dove più di un composto viene somministrato contemporaneamente nello stesso animale in modo da ottenere più profili contemporaneamente. I vantaggi di questo approccio sono il significativo ridotto utilizzo di animali, la ridotta variabilità inter-animale, la possibilità di ottenere contemporaneamente informazioni su una serie di composti anche simili e quindi costruire relazioni tra struttura e proprietà farmacocinetiche.

Questo protocollo può però essere inficiato dalle interazioni farmacocinetiche delle sostanze somministrate.

Strategie per aumentare la biodisponibilità orale

La biodisponibilità orale rappresenta la percentuale di farmaco che raggiunge effettivamente il flusso sanguigno ed è governata dall'assorbimento del tratto gastrointestinale e dal metabolismo epatico (effetto di primo passaggio) che la frazione assorbita subisce prima di entrare nel circolo sistemico.

Una combinazione di screening in vitro e in vivo viene generalmente utilizzata per valutare la biodisponibilità e la sua predizione nell'uomo di nuovi candidati farmaci (Figura 48.2A).

L'approccio in vitro si basa inizialmente su una misura della permeabilità dei composti test tramite colture cellulari come descritto in precedenza. L'approccio in vivo prevede naturalmente la determinazione della farmacocinetica dopo somministrazione orale e endovenosa nel ratto (o in alternativa nel topo) e calcolo della biodisponibilità. Se l'assorbimento è all'interno di valori accettabili nel ratto (e per conferma in altre specie, quali ad esempio il cane) è probabile che lo sia anche nell'uomo. A supporto di questo approccio numerose ricerche testimoniano la correlazione tra l'assorbimento in specie animali (pre-cliniche) e l'uomo, nonostante esistano differenze significative nella fisiologia del tratto gastrointestinale e del tempo di transito.

Dopo la permeabilità e l'assorbimento, un altro aspetto da monitorare per ottimizzare la biodisponibilità è l'effetto di primo passaggio, ossia la quantità di composto assorbito che viene eliminato metabolicamente dalla parete intesi-

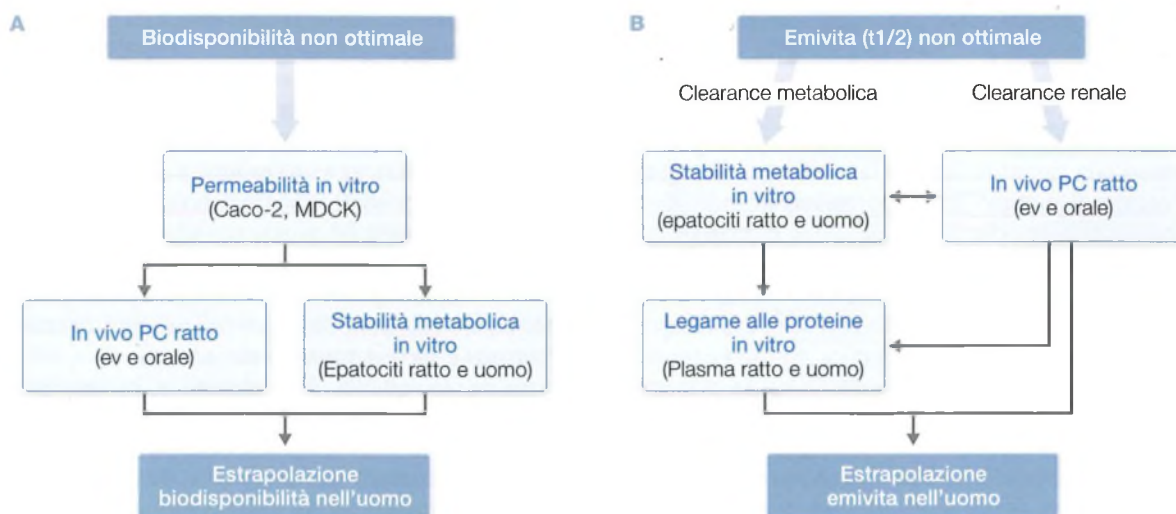


FIGURA 48.2 Cascate di saggi per l'ottimizzazione dei farmaci. Le strategie e l'utilizzo dei vari saggi disponibili durante le fasi di ricerca variano a seconda del parametro farmacocinetico da ottimizzare. Quando possibile, inoltre, i saggi vengono eseguiti in maniera sequenziale, privilegiando in prima battuta i test in vitro e ad alta cadenza, dai quali un numero ridotto di molecole viene selezionato per essere valutato in saggi a più bassa produttività o test in vivo.

nale e dal fegato prima di raggiungere il flusso sanguigno. Contrariamente a quanto accettato per la permeabilità, in questo caso le differenze metaboliche tra specie, incluso l'uomo, possono essere significative e pertanto la valutazione in vitro della stabilità metabolica, ad esempio in microsomi di fegato, e il confronto tra una o più specie pre-cliniche e l'uomo diventa un passaggio determinante.

Strategie per ottimizzare l'emivita

L'emivita ($t_{1/2}$) è un parametro farmacocinetico che indica il tempo richiesto per ridurre del 50% la quantità di un farmaco nel sangue. L'emivita, o tempo di dimezzamento di un farmaco, è inversamente proporzionale alla sua velocità di eliminazione (clearance, Cl) e direttamente proporzionale alla sua capacità di accumularsi nei tessuti (volume di distribuzione, Vd). Cioè all'aumentare della clearance l'emivita diminuisce, viceversa all'aumentare del volume di distribuzione l'emivita aumenta. Nelle fasi di ricerca l'obiettivo principale è "disegnare" nei candidati farmaci l'emivita ottimale per espletare l'effetto farmacologico tramite modificazioni chimiche della molecola. Tale scopo viene normalmente raggiunto controllando la clearance del composto tramite studi di stabilità metabolica in vitro se la clearance è prevalentemente epatica o studi in vivo e determinazione del legame alle proteine plasmatiche in vitro se invece la clearance è prevalentemente guidata da escrezione renale (Figura 48.2B).

Farmacocinetica come scienza traslazionale

Si parla di ricerca traslazionale quando la ricerca pre-clinica riesce a produrre risultati rapidamente trasferibili

all'attività clinica; la ricerca traslazionale rappresenta l'integrazione tra l'attività di ricerca sperimentale e la pratica clinica.

Gli screening DMPK in vitro e in vivo descritti in precedenza, condotti ben prima che il composto venga effettivamente somministrato all'uomo per la prima volta, rappresentano una parte vitale del processo di ottimizzazione di nuovi farmaci. Tali screening non solo guidano la sintesi di nuovi composti con migliori proprietà, ma spesso pongono le basi per la predizione della farmacocinetica nell'uomo e, di conseguenza, della dose ritenuta efficace. La predizione della farmacocinetica nell'uomo è infatti uno degli aspetti determinanti sin dalle prime fasi della ricerca e tutti gli studi sono configurati in modo da posizionare le informazioni ottenute in un contesto clinico. Come anticipato in precedenza, tutti gli screening in vitro includono sempre misurazioni in tessuti o derivati umani, e i protocolli in vivo in specie pre-cliniche sono sempre accompagnati da una proiezione di quanto il dato rifletta la reale farmacocinetica nell'uomo. Proprietà farmacocinetiche, quali biodisponibilità, clearance, volume di distribuzione, possono infatti essere predette da esperimenti in vitro e/o in vivo su specie pre-cliniche attraverso simulazioni e modelli matematici a vari livelli di complessità.

In aggiunta a questo, le misurazioni farmacocinetiche fatte oramai di routine durante esperimenti di efficacia in specie pre-cliniche hanno l'obiettivo di stabilire già a questo livello la relazione tra farmacocinetica e farmacodinamica (PK/PD, *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*), essenziale per stabilire la potenzialità di qualsiasi farmaco e predire l'efficacia e la dose clinica. La terapia farmacologica infatti si basa sull'assunzione che esiste una relazione causale tra dose, concentrazioni del farmaco nel sangue (farmacocinetica) e il suo effetto terapeutico

(farmacodinamica), come pure con i suoi effetti collaterali. Di conseguenza, l'obiettivo principale della ricerca è quello di capire quanto prima i fattori che regolano il legame tra farmacocinetica e farmacodinamica e quindi determinare quale è il dosaggio ottimale per il paziente in modo da garantire l'effetto farmacologico desiderato e limitare al minimo gli effetti collaterali indesiderati. È bene precisare che la relazione tra farmacocinetica e farmacodinamica o farmacocinetica e tossicità, per quanto intuitivamente ovvia, non è affatto scontata e va dimostrata per ogni farmaco. La non completa comprensione del legame tra farmacocinetica, efficacia e tossicità è, ancora oggi, riconosciuta come la causa principale di fallimento della progressione di nuovi farmaci nel processo di sviluppo.

Farmacocinetica e metabolismo nelle fasi di sviluppo

Una volta che una determinata molecola è stata selezionata in base alle sue caratteristiche, deve essere valutata per la sua sicurezza ed efficacia secondo quanto richiesto dalle varie autorità regolatorie e come descritto nei Capitoli 3 e 4. In questa fase pertanto la farmacocinetica assume un ruolo più classico di caratterizzazione e descrizione approfondita della caratteristiche farmacocinetiche e metaboliche. In altre parole, le informazioni farmacocinetiche generate in questa fase hanno l'obiettivo principale di essere usate come "indicatori" degli effetti farmacologici o indesiderati del farmaco sull'organismo.

Studi con l'uso di molecole radioattive

Tra i numerosi studi pre-clinici o non clinici (studi in vitro) che sono generalmente condotti durante lo sviluppo, vale la pena di accennare a quelli che prevedono l'uso di composti radioattivi. La molecola che si studia viene sintetizzata sostituendo con un isotopo radioattivo, generalmente carbonio ^{14}C , un isotopo stabile ^{12}C . Si segue quindi abbastanza facilmente, grazie a strumenti che rilevano la radioattività, il percorso che le molecole radioattive compiono all'interno dell'organismo una volta somministrate negli animali. È possibile svolgere prove di distribuzione tissutale, anche su intere sezioni di un animale (la cosiddetta autoradiografia a corpo intero, Figura 48.3), determinare i livelli plasmatici e la concentrazione di radioattività negli escreti e quindi il cosiddetto "bilan-

cio" cioè la percentuale della dose eliminata nelle urine e nelle feci. Tutte queste informazioni consentono di capire quanto a lungo il prodotto rimane nell'organismo, se vi sono organi di accumulo, in quanto tempo viene assorbito ad esempio dopo somministrazione orale e così via. Siccome la radioattività è una proprietà dell'isotopo, sono radioattivi sia il prodotto che i metaboliti che conservino quell'atomo: è possibile quindi, usando tecniche cromatografiche, determinare il cosiddetto profilo metabolico, cioè determinare quanti metaboliti siano presenti in un determinato campione biologico (ad esempio, di urina o di plasma) e successivamente identificarli.

Normalmente, quando il composto è in fase molto avanzata di sviluppo, viene anche condotto il cosiddetto studio di ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Eliminazione) nell'uomo dove si somministra a pochi volontari il prodotto radioattivo (naturalmente a dosi di radioattività basse tali da non causare alcun danno). Questa prova veniva fino a pochi anni fa considerata un po' la "prova regina" degli studi di farmacocinetica in quanto dava il quadro esatto del metabolismo nell'uomo e consentiva di confrontarlo con quello delle specie animali usate nelle prove tossicologiche.

Oggi di fatto non è più così perché si tende ad anticipare le informazioni sui metaboliti umani, in quanto le attuali strumentazioni analitiche consentono di ottenere quasi tutte queste informazioni senza bisogno di somministrare il composto radioattivo. Inoltre negli ultimi anni l'affermarsi della spettrometria di massa con acceleratore (AMS, *Accelerator Mass Spectrometry*) consente di rilevare la presenza di piccolissime concentrazioni di isotopi radioattivi per cui si possono somministrare al volontario prodotti che contengono quantità di radioattività del tutto trascurabile.

Ruolo della farmacocinetica negli studi di tossicità

La somministrazione all'uomo di un composto sperimentale deve essere, secondo quanto descritto nel Capitolo 3, preceduta e accompagnata da prove di tossicità in vitro e nell'animale. Vi è un legame ben definito tra questi studi, la loro durata, la numerosità degli animali e il protocollo che si intende seguire nell'uomo; le informazioni farmacocinetiche in questo ambito hanno il ruolo di "convalidare" gli studi di tossicità.

Per quanto riguarda le prove in vitro, queste in genere consistono nell'incubazione di cellule o di preparati

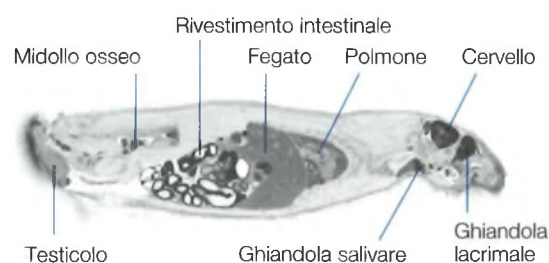


FIGURA 48.3 Autoradiografia a corpo intero in ratto dopo somministrazione orale di un farmaco radioattivo. L'autoradiografia è una tecnica basata sulla proprietà delle radiazioni di impressionare una pellicola fotografica. Se la pellicola viene messa a contatto con una sezione di tessuto biologico, ad esempio una sezione a corpo intero di ratto al quale è stato somministrato precedentemente un farmaco radioattivo, si otterrà un'immagine permanente (autoradiogramma) che riproduce la localizzazione della radioattività presente nella sezione e anche la sua concentrazione, proporzionale al maggiore o minore annerimento della pellicola.

subcellulari: è necessario controllare che il prodotto sia effettivamente disciolto nel sistema e che la concentrazione a cui si esegue lo studio sia quella desiderata, cioè che non vi siano fenomeni di precipitazione, adsorbimento aspecifico, ad esempio alle pareti delle provette, o degradazione chimica o metabolica.

Per gli studi in vivo vengono misurate le concentrazioni ematiche del prodotto negli stessi animali in cui vengono fatte le valutazioni tossicologiche per essere certi che la prova abbia effettivamente esposto gli animali a concentrazioni più alte di quelle a cui si intende esporre l'uomo. Viene definita "tossicocinetica" la farmacocinetica determinata appunto nelle prove di tossicità.

La farmacocinetica è dunque differente dalla tossicocinetica dato che i dati ottenuti hanno il solo esclusivo obiettivo di stimare l'esposizione raggiunta ai vari dosaggi utilizzati. I dati ottenuti vengono poi utilizzati per correlare gli effetti tossicologici osservati da cui viene ricavata la rilevanza clinica.

Studio dei metaboliti

Come viene più ampiamente discusso nel Capitolo 52, il processo di biotrasformazione o metabolismo prevede che il farmaco progenitore possa essere convertito in uno o più metaboliti (farmacologicamente attivi o inattivi) dotati di maggiore polarità, quindi più idrosolubili e facilmente eliminabili con l'urina o con la bile. Tale processo avviene attraverso la trasformazione dei gruppi funzionali della molecola (reazioni di Fase I: ossidazioni, riduzioni e idrolisi) e la successiva coniugazione con sostanze endogene (reazioni di Fase II: glucuronidazione e solfatazione, ad esempio). I metaboliti originati da molti farmaci producono essi stessi effetti terapeutici e/o effetti collaterali che possono essere simili, diversi, o completamente nuovi rispetto alla molecola di partenza (Figura 48.4). La valutazione dell'attività di un farmaco dipende anche dalla presenza di eventuali effetti che i metaboliti possono produrre.

Lo studio dei metaboliti riveste un'importanza fondamentale per quanto concerne i farmaci e, particolarmente negli ultimi anni, nuove strategie sono state discusse e implementate durante tutto il processo di ricerca.

Metaboliti stabili

Nel 2002 una pubblicazione sponsorizzata dalla *US Pharmaceutical Research and Manufacturing Association* (PhRMA) ha delineato una serie di considerazioni legate allo studio e alla valutazione dei metaboliti durante gli studi di tossicità dei candidati farmaci e abbozzato dei possibili approcci pratici. Questa pubblicazione, che ha coniato il termine MIST (*Metabolites In Safety Testing*), ha dato inizio a un acceso dibattito tra l'industria farmaceutica e le autorità regolatorie, come la *Food and Drug Administration* (FDA), sugli approcci proposti dal documento MIST. In particolare il dibattito si è incentrato sulla quantità di investimenti da dedicare

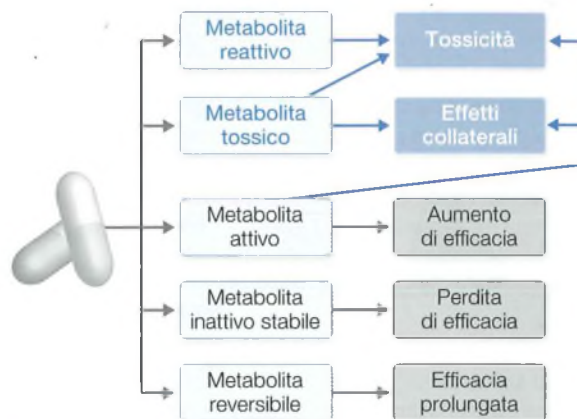


FIGURA 48.4 Risultato del processo di biotrasformazione dei farmaci. Un farmaco, dopo essere stato assorbito, viene trasformato in più molecole diverse le quali possono risultare inerti, ma anche generare esse stesse effetti farmacologici o tossici sull'organismo.

alla valutazione della tossicità dei vari metaboliti, in particolare modo di quei metaboliti che si formano dopo somministrazione nell'uomo ma che si formano in quantità ridotte nelle specie nella quale viene testata la tossicità, o non si formano affatto.

Indipendentemente dal dibattito sopra citato, è chiaro che verrà richiesto un progressivo aumento di informazioni e valutazioni sul profilo metabolico dei candidati farmaci e che particolare attenzione verrà posta ai metaboliti circolanti nel sangue dopo somministrazione nell'uomo.

Metaboliti reattivi

Sebbene il metabolismo delle sostanze esogene e dei farmaci conduca nella maggior parte dei casi a entità chimiche stabili, talvolta tale processo passa attraverso la formazione di intermedi che possono essere altamente reattivi. Questo può accadere in ogni fase della biotrasformazione di un farmaco, ma è stato osservato che le reazioni più suscettibili di un simile effetto sono quelle di fase I catalizzate dal citocromo P450. È noto inoltre che sono più suscettibili di bioattivazione quei farmaci che presentano siti elettrofili. I metaboliti, o gli intermedi, possono essere chimicamente più o meno reattivi e pertanto dare luogo a reazioni e fenomeni diversi (Figura 48.5). Questi composti infatti possono reagire con i gruppi nucleofili di costituenti vitali della cellula, come i gruppi ossidrilici, solfidrici e amminici di proteine funzionali o di acidi nucleici, compromettendone la funzionalità, come ad esempio gli stessi enzimi metabolizzanti del citocromo P450, dando luogo a una forma di inibizione irreversibile. Inoltre il legame covalente con queste proteine può dare origine a macromolecole riconosciute come esogene dall'organismo e quindi intercettabili dal sistema immunitario che può dare luogo a reazioni idiosincratice.

Già negli anni 40 si era ipotizzato che processi di bioat-

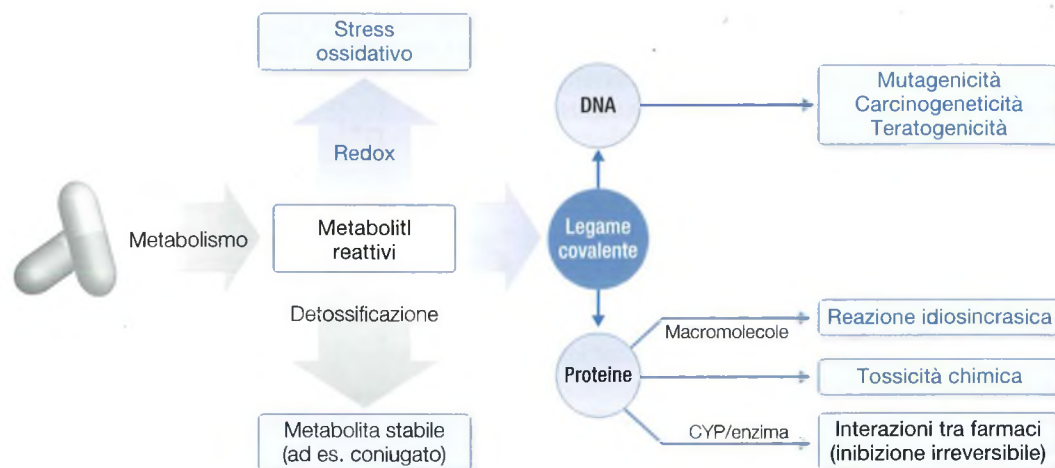


FIGURA 48.5 Possibili effetti tossicologici del processo di bioattivazione. La bioattivazione è un processo metabolico che può aumentare la tossicità della sostanza tramite la formazione di intermedi instabili, ovvero metaboliti con legami chimici altamente reattivi in grado di reagire con le macromolecole organiche. In particolare, legami al DNA possono dare luogo a effetti cancerogeni. Il legame covalente agli stessi enzimi del citocromo P450 può dare luogo a una inattivazione degli enzimi stessi (inibizione irreversibile), mentre il legame ad altre macromolecole può scatenare fenomeni di reazione idiosincrasica al farmaco, una delle maggiori cause di reazione avversa ai farmaci.

tivazione e la formazione di metaboliti reattivi potessero avere un ruolo nella tossicità di alcuni farmaci.

Tra gli intermedi reattivi più frequentemente implicati in reazioni di tossificazione si possono citare a titolo di esempio gli epossidi, gli N-idrossiderivati, le alchilnitrosammine, i radicali liberi e gli alogenuri di acile.

Farmacocinetica e metabolismo nelle fasi cliniche

Quando un farmaco approccia le fasi cliniche molti degli studi condotti sia sul volontario sano che sul paziente hanno come scopo principale la valutazione del profilo farmacocinetico (Tabella 48.2).

I primi studi che vengono condotti nel volontario sano sono generalmente definiti di "tollerabilità e farmacocinetica" indicando con ciò che la caratterizzazione farmacocinetica è uno dei principali obiettivi. Proprio nel

primo studio si determinano le concentrazioni ematiche e quindi si verifica se le caratteristiche farmacocinetiche sono effettivamente quelle previste dai vari studi in vitro e in vivo pre-clinici e se sono adeguate al profilo richiesto per espletare l'attività terapeutica attesa.

Gli studi di farmacocinetica clinica continuano poi praticamente fino alla registrazione del farmaco. Vi sono studi che cercano di correlare "attività e farmacocinetica" o "tossicità e farmacocinetica", valutazioni di potenziali differenze farmacocinetiche nel paziente rispetto al volontario o in popolazioni particolari (ad esempio, anziani, bambini) o ancora studi su nuove formulazioni.

Vengono accennati di seguito due concetti di particolare rilievo per la farmacocinetica clinica: la variabilità farmacocinetica e le interazioni con altri farmaci.

Variabilità farmacocinetica e sue cause

Come descritto in maggior dettaglio nel Capitolo 54, molti farmaci mostrano un'alta variabilità farmacocinetica. A parità di dose si possono avere livelli ematici assai diversi (anche di 10 volte) tra individui e, talvolta, anche nello stesso individuo in giorni diversi. Le cause possono essere varie e complesse; alcune tra le principali possono essere studiate nell'ambito degli studi farmacocinetici e metabolici che, ad esempio, consentono di conoscere quali sono gli enzimi responsabili del metabolismo e quali sono i processi di clearance del farmaco.

Se un farmaco è prevalentemente escreto per via urinaria come tale, è improbabile che riduzioni della funzione epatica ne possano alterare la farmacocinetica mentre è verosimile che lo possano fare variazioni della funzionalità renale; viceversa per un farmaco la cui clearance dipende interamente dal metabolismo epatico. Questa informazione potrà consentire di valutare i rischi e suggerire di condurre studi in individui a ridotta funzionalità

TABELLA 48.2 Studi clinici con caratterizzazione farmacocinetica

Primo studio nell'uomo (FTIM, <i>First Time In Man</i>) a dose singola e crescente
Studio clinico a dose ripetuta
Valutazione Proporzionalità Dose/esposizione
Valutazione della farmacocinetica in subpopolazioni (maschi/femmine; giovani/anziani; caucasici/asiatici; funzione renale o epatica ridotta)
Studio ADME nel volontario
Valutazioni dell'interazione tra farmaci
Studi di farmacocinetica e farmacodinamica su volontari sani e/o su pazienti
Studi di bioequivalenza tra formulazioni diverse

epatica e/o renale per verificare quanto siano alterati i livelli plasmatici.

Ancora, se un farmaco è metabolizzato da enzimi polimorfi, come il 2D6, si potrà prevedere che ci siano gruppi di individui con clearance ridotta e quindi livelli ematici più elevati. Tutte queste informazioni servono a definire un piano clinico il più razionale possibile per ogni composto, ad anticipare il rischio di possibile variabilità, a interpretarne le cause e a facilitare una medicina personalizzata (vedi Capitolo 54).

Interazioni con altri farmaci

Le interazioni di carattere farmacocinetico sono frequenti e sono talvolta causa di effetti collaterali gravi. Le interazioni più importanti sono a livello metabolico e di trasportatori. L'argomento è trattato più diffusamente nel Capitolo 55, in questa sede si vuole evidenziare l'importanza degli studi farmacocinetici atti a comprendere, definire e prevedere queste interazioni.

In seguito ai numerosi studi effettuati allo scopo di caratterizzare le diverse isoforme del CYP450 e di definire l'esistenza di substrati, inibitori o induttori più o meno selettivi, è oggi possibile, utilizzando diversi approcci, in vitro e in vivo, identificare quali isoforme siano responsabili del metabolismo di un nuovo farmaco e prevedere la possibilità che esso sia soggetto a interazioni con altri farmaci, specialmente se comunemente utilizzato in polifarmacoterapia. Sulla base dell'IC₅₀ (concentrazione che inibisce il 50% dell'attività dell'enzima) e delle concentrazioni già misurate o previste nell'uomo si può prevedere se ci sarà o no una interazione clinica significativa con un determinato farmaco o gruppo di farmaci.

La strategia per studiare il potenziale di interazione di un farmaco con altri farmaci e la possibilità di condurre studi di interazione in vitro è di estrema importanza in quanto le possibili cause sono numerose e praticamente impossibili da valutare tutte in studi clinici dedicati. Sulla base delle informazioni in vitro si può condurre solo un limitato numero di studi clinici di interazione, ben mirati a quei farmaci per cui si ipotizza un rischio.

Farmacocinetica e formulazione: i farmaci "equivalenti"

Come illustrato nel Capitolo 50, la via di somministrazione e la formulazione possono alterare la farmacocinetica di un composto e quindi i suoi effetti.

L'introduzione di una nuova formulazione per un prodotto già in commercio o di cui sia già stata dimostrata l'attività con un'altra formulazione non comporta, in genere, di dover ripetere daccapo gli studi di efficacia. Di solito è sufficiente dimostrare che i livelli ematici conseguiti dopo somministrazione della nuova formulazione sono appropriati per raggiungere l'effetto desiderato. Studi farmacocinetici di confronto tra varie formulazioni possono pertanto consentire di ritenere validi studi di efficacia generati con una di esse anche per le altre.

Di particolare interesse è il concetto di "bioequivalenza" sul quale si fonda la possibilità di registrare i farmaci cosiddetti "equivalenti" o "generici". Quando il brevetto di un farmaco scade (vedi Capitolo 3), altre aziende possono metterlo in commercio purché dimostrino l'equivalenza del loro prodotto rispetto all'originale.

Per "equivalente" si intende che abbia gli stessi effetti alle stesse dosi. Attualmente in Italia per convenzione giuridica si intende "equivalente" un farmaco che abbia una biodisponibilità che rientra nel $\pm 20\%$ del composto di riferimento.

Per far questo non è necessario ripetere tutti gli studi clinici, cosa che sarebbe estremamente onerosa, ma basta dimostrare che il preparato determina concentrazioni ematiche eguali a quelle del preparato originale, sia in termini di esposizione sia in termini di concentrazione ematica massima raggiunta (C_{max}). Semplificando, si tratta di eseguire uno studio su un numero adeguato di volontari somministrando loro, in due sessioni separate, il prodotto originale e quello "generico" e di dimostrare che i livelli ematici sono confrontabili.

Di solito, viene fatto il confronto dopo somministrazione singola anche se vi sono casi in cui si preferisce condurlo allo stato stazionario, dopo cioè somministrazione cronica.

Svilupi futuri della disciplina di farmacocinetica e metabolismo

L'evoluzione che la disciplina di farmacocinetica e metabolismo (DMPK) ha avuto negli ultimi anni ha sicuramente contribuito a ridurre il numero di potenziali farmaci che venivano fermati a vari stadi del processo di sviluppo per cause strettamente legate alla farmacocinetica del composto, tuttavia la percentuale di molecole che completano con successo la fase di sviluppo e vengono rese disponibili ai pazienti non è aumentata. Le maggiori cause di fallimento si sono di fatto spostate più verso una non soddisfacente efficacia o una non accettabile tossicità delle molecole inserite nel processo di sviluppo. Quindi in quale direzione la disciplina di farmacocinetica, intesa come scienza, deve evolvere per rendere più produttivo ed efficiente il processo di ricerca e sviluppo di nuovi farmaci?

Nonostante la complessità della materia ci sembra che la farmacocinetica dovrà guidare il processo verso una maggiore integrazione dei tre aspetti che alla fine determinano lo sviluppo di un nuovo farmaco: efficacia, tossicità e cinetica. Il ruolo guida che la farmacocinetica deve avere è legittimato dal fatto che qualsiasi effetto, sia esso terapeutico o tossico, è comunque determinato dalle concentrazioni del farmaco e dei suoi metaboliti nel sangue e nei vari tessuti e dalla loro cinetica. Un legame più stretto tra concentrazione ed effetto farmacologico (o tossico) può essere ottenuto, ad esempio, cercando di stimare in modo più sistematico le concentrazioni reali al sito d'azione (biofase) che, nella maggior parte dei casi, sono molto distanti dalle concentrazioni misurate nel sangue e usate per descrivere la farmacocinetica del composto.

Composti molto efficaci in test di attività in vitro e con un'ottima farmacocinetica (intesa come biodisponibilità, emivita ecc.) possono non essere in grado di raggiungere il bersaglio biologico (recettore, proteina, DNA) e quindi espletare l'effetto desiderato. Concetti come "efficienza del farmaco" (drug efficiency) che cercano di dare una stima della reale concentrazione disponibile per interagire con il target biologico (concentrazione nella biofase) cominciano a entrare nel processo di ottimizzazione dei composti guida e sicuramente daranno un contributo nel disegnare farmaci migliori.

Dal punto di vista scientifico e tecnologico, l'avanzamento e la comprensione di argomenti come la farmacogenetica, la farmacogenomica, la metabolomica e la loro integrazione con gli aspetti più tradizionali di farmacocinetica e metabolismo avranno sicuramente un grosso impatto sulla comprensione e predizione di aspetti come l'interazione tra farmaci, vie di metabolismo ed eliminazione, meccanismi di bioattivazione e tossicità, e potranno portare a farmaci migliori, più sicuri fino ad arrivare a una effettiva personalizzazione della terapia.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Tradizionalmente la disciplina di farmacocinetica e metabolismo si è concentrata nel descrivere gli aspetti classici di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione (ADME).
- ▶ Nel corso degli ultimi due decenni si è assistito a una significativa evoluzione della disciplina, passando da una scienza puramente descrittiva delle proprietà di un candidato farmaco a una scienza più predittiva, in grado di intervenire nel disegno, nella definizione e nella selezione dei nuovi candidati farmaci.
- ▶ La farmacocinetica può essere considerata come una scienza traslazionale, in quanto sin dalle prime fasi della ricerca tutti gli studi condotti in vitro o in vivo in specie pre-cliniche sono configurati in modo da posizionare le informazioni ottenute in un contesto clinico.
- ▶ Parallelamente allo studio della farmacocinetica è anche aumentato l'interesse per lo studio dei metaboliti di cui oggi si studia in modo approfondito il potenziale contributo all'attività farmacologica e alla tossicità.

Bibliografia essenziale

- ▶ Baillie TA. Metabolism and toxicity of drugs. Two decades of progress in industrial drug metabolism. *Chem Res Toxicol* 2008; 21:129-37.
- ▶ Braggio S, Montanari D, Rossi T, Ratti E. Drug efficiency: a new concept to guide lead optimization programs towards the selection of better clinical candidates. *Expert Opin Drug Discov* 2010;5:609-18.
- ▶ Hop CE, Cole MJ, Davidson RE et al. High throughput ADME screening: practical considerations, impact on the portfolio and enabler of in silico ADME models. *Current Drug Metabolism* 2008;9:847-53.
- ▶ ICH M3(R2). Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. Medford (NJ): GMP Publications, Inc., 2009.
- ▶ Nedderman AN, Dear GJ, North S et al. From definition to implementation: a cross-industry perspective of past, current and future MIST strategies. *Xenobiotica* 2011;41(8):605-22.
- ▶ Pellegatti M, Pagliaruso S, Solazzo L, Colato D. Plasma protein binding and blood-free concentrations: which studies are needed to develop a drug? *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;7(8):1009-20.
- ▶ Read K, Braggio S. Assessing brain free fraction in early drug discovery. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010;6:337-344.
- ▶ Summerfield S, Jeffrey P. Discovery DMPK: changing paradigms in the eighties, nineties and noughties. *Expert Opin Drug Discov* 2009;4:207-18.
- ▶ Singh SS. Pre-clinical Pharmacokinetics: An approach towards safer and efficacious drugs. *Current Drug Metabolism* 2006;7:165-82.
- ▶ Yengi LG, Leung L, Kao J. The evolving role of drug metabolism in drug discovery and development. *Pharmaceutical Research* 2007;24:842-58.
- ▶ Zonzini L, Bianchi F, Cesari N, Sartori M. In vivo rat PK profiling in drug discovery: new challenges. *Expert Opin Drug Discov* 2010;5:1031-7.

Basi cellulari della farmacocinetica

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

Obiettivi formativi

- Comprendere il ruolo di assorbimento, distribuzione, metabolizzazione ed escrezione nel determinare gli andamenti delle concentrazioni del farmaco nei vari tessuti dell'organismo e sugli organi bersaglio
- Conoscere le caratteristiche delle principali barriere cellulari che il farmaco deve superare per raggiungere il suo bersaglio
- Conoscere le modalità con cui il farmaco può attraversare le membrane e le barriere cellulari per spostarsi tra i vari compartimenti dell'organismo

Il successo di una terapia è legato alla correttezza della diagnosi e alla oculatezza nella scelta dello strumento farmacologico. Occorre dunque conoscere le proprietà terapeutiche del farmaco e i suoi effetti indesiderati. Ma, come trattato nel Capitolo 4, l'entità delle risposte a un farmaco è funzione della sua concentrazione sul sito d'azione: un dosaggio troppo basso produrrà risposte inadeguate, mentre con uno troppo alto l'entità degli effetti indesiderati potrà essere tale da vanificare l'efficacia della terapia.

Solo tra questi due limiti – che definiscono la *finestra terapeutica* – l'intervento farmacologico è corretto. La questione diviene particolarmente delicata quando il rapporto tra concentrazione che dà luogo a effetti tossici e concentrazione efficace – l'*indice terapeutico* – è basso. Viceversa, più alto è l'indice terapeutico, più maneggevole è il farmaco. La domanda che il medico deve porsi, una volta scelto il farmaco da usare, è dunque come ottenere nel paziente una concentrazione che sia all'interno della finestra terapeutica: quanto farmaco somministrare, per quale via e con che frequenza. La risposta richiede la conoscenza dei principi biologici generali che regolano l'assorbimento dei farmaci, la loro distribuzione all'interno dell'organismo e la loro eliminazione. Tali principi costituiscono le basi della *farmacocinetica*.

Data la complessità degli argomenti trattati nei capitoli 49, 50, 51, 53, si è ritenuto utile proporre negli Approfondimenti in CD una versione articolata che facilitasse i richiami ai vari aspetti della farmacocinetica (vedi CD: Approfondimento 49.1. *Approccio integrato alla farmacocinetica*).

Rapido viaggio con il farmaco nell'organismo

Per giungere all'organo bersaglio il farmaco deve essere assorbito

In alcuni casi il farmaco si somministra direttamente là dove deve svolgere la sua azione. È il caso, ad esempio dei farmaci antiacidi, che neutralizzano l'iperacidità gastrica nel lume senza essere assorbiti, o degli anestetici locali che vengono somministrati direttamente nei liquidi interstiziali della regione interessata.

In generale, però, l'organo bersaglio su cui il farmaco dovrebbe agire è situato lontano dal punto di somministrazione. Per arrivarvi il farmaco utilizza il torrente circolatorio. A meno che non venga introdotto direttamente nei vasi mediante iniezione, la prima tappa che caratterizza il viaggio del farmaco all'interno del corpo è perciò l'*assorbimento*, ovvero la serie di processi che consentono il passaggio del farmaco nel circolo ematico (fase di *assorbimento* nella Figura 49.1). Nel caso di una somministrazione interstiziale (intramuscolare o sottocutanea), il farmaco dovrà diffondere dal sito di iniezione e superare l'ostacolo delle cellule endoteliali. Per qualunque altra via di somministrazione (orale, rettale, sublinguale, transcutanea ecc.), il farmaco dovrà anche superare la barriera epiteliale che separa il mondo esterno dall'interstizio.

Oltre a giungere all'organo bersaglio, il farmaco si distribuisce nei vari tessuti del corpo

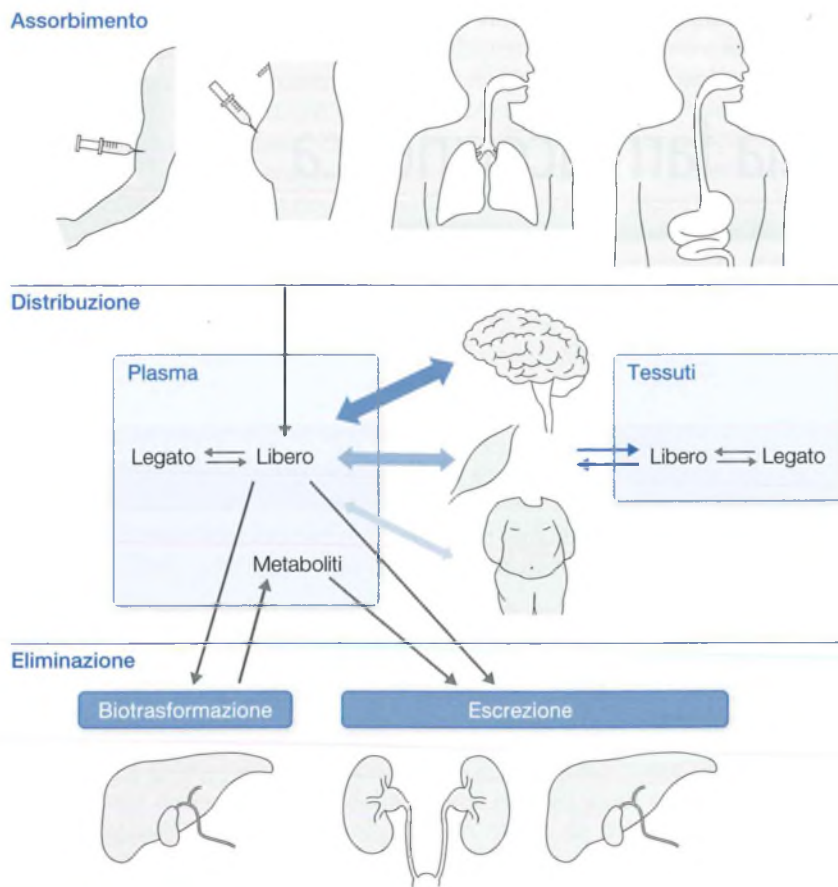


FIGURA 49.1 Viaggio del farmaco nel corpo. Dal punto di vista concettuale si possono distinguere tre fasi, non necessariamente ben distinte nel tempo: assorbimento, distribuzione ed eliminazione. La velocità dell'assorbimento può variare a seconda della via di somministrazione utilizzata. Una volta assorbito, il farmaco si distribuisce ai vari tessuti attraverso la rete vascolare, diffonde negli spazi interstiziali e raggiunge le cellule, tra cui quelle che rappresentano il bersaglio terapeutico del farmaco. Nel plasma, come pure nei tessuti, il farmaco può essere libero nella fase acquosa o legato a proteine (plasmatiche o tissutali). L'eliminazione può avvenire per biotrasformazione o per escrezione. Benché il rene sia l'organo emuntorio principale, anche il fegato e altre ghiandole secernenti possono essere quantitativamente importanti nei processi di escrezione. Lo stesso vale per la biotrasformazione che è principalmente effettuata a livello epatico, ma che può avvenire in molti altri distretti.

Una volta immesso nel torrente circolatorio, il farmaco è in grado di diffondere nell'intero organismo (fase di *distribuzione* nella Figura 49.1). Il passaggio nei liquidi interstiziali avviene a livello capillare e può essere influenzato dalla permeabilità del letto vascolare. Quest'ultima dipende dall'organizzazione anatomica della rete capillare che può differire nei vari distretti (ad esempio SNC, placenta) e dalla eventuale presenza di processi patologici (ad esempio infiammazione). La membrana basale dell'endotelio rende la diffusione estremamente limitata per sostanze con peso molecolare dell'ordine o superiore a quello dell'albumina (a esclusione dei sinusoidi epatici). La diffusione del farmaco ai tessuti è pertanto notevolmente compromessa dal suo eventuale legame alle proteine plasmatiche (o agli elementi corpuscolati del sangue).

Attraverso il sangue, il farmaco si distribuisce a *tutti* gli organi del corpo. Questo processo di distribuzione non è in genere omogeneo. Infatti, nelle prime fasi che seguono alla somministrazione, il farmaco raggiunge i diversi compartimenti del corpo con velocità diverse, principalmente a causa del diverso grado di irrorazione dei vari organi (freccie di dimensioni diverse nella figura). Inoltre, la sua concentrazione nei vari compartimenti del corpo, una volta raggiunto l'equilibrio, può essere significativamente diversa rispetto a quella ematica ("tropismo" del farmaco per organi o tessuti specifici). In conseguenza dei processi di distribuzione, ad esempio, una stessa

dose di un antibiotico potrebbe essere efficace in caso di polmonite, ma inefficace nel caso di ascesso gluteo dovuto allo stesso agente patogeno.

■ Il farmaco viene eliminato

Un'alta frazione del flusso plasmatico sistemico è diretto al rene, dove una quota elevata attraversa il filtro glomerulare. In questo modo circa il 4% di tutto il liquido plasmatico passa nel tubulo renale ogni minuto. Tutto il farmaco che vi è contenuto – a meno che sia legato alle proteine plasmatiche – viene dunque immesso nella preurina (circa 1/25 di tutto il farmaco presente in circolo in forma libera). Quelle molecole di farmaco che non verranno riassorbite lungo il decorso del nefrone verranno eliminate con le urine. *L'eliminazione* può anche avvenire a livello alveolare (soprattutto per i gas), o attraverso altre secrezioni, quali sudore e bile. Nell'ultimo caso una parte del farmaco può essere riassorbita a livello intestinale (circolo entero-epatico). Il farmaco può venire eliminato prima di essere rimosso dall'organismo, attraverso processi di metabolizzazione enzimatica che ne possono modificare sia le proprietà farmacocinetiche che l'efficacia. Benché tutte le cellule e tutti gli organi possano potenzialmente metabolizzare i farmaci, senza dubbio il fegato è l'organo più coinvolto in questo genere di attività.

A mano a mano che il farmaco è eliminato, la sua concentrazione plasmatica diminuisce e il suo effetto può

svanire; nel caso di somministrazioni ripetute, ogni nuova dose va ad aggiungersi a ciò che è rimasto delle precedenti nel corpo del paziente. È quindi chiaro che alterazioni patologiche o funzionali dei processi di rimozione possono modificare sia la durata d'azione del farmaco che la quantità totale di farmaco che si accumula nel corpo del paziente nel corso di una terapia prolungata. Se la velocità di eliminazione diminuisce, la concentrazione plasmatica del farmaco può raggiungere livelli tali da provocare effetti indesiderati. Compito del medico è quindi non solo quello di scegliere la terapia e la posologia più indicate per ciascun paziente, ma anche prevedere come l'insorgenza di alcune patologie possa richiedere modificazioni del regime terapeutico.

Passaggio dei farmaci attraverso le membrane cellulari

Dalla sede di somministrazione, il farmaco raggiunge il circolo ematico, si distribuisce nei vari organi/tessuti e giunge sul suo sito d'azione. Se la via di somministrazione è quella orale, il farmaco deve attraversare lo strato di cellule epiteliali che riveste il lume gastroenterico, penetrare nel circolo linfatico/ematico e lasciarlo in un altro punto dell'organismo, eventualmente superando ulteriori barriere cellulari (come, ad esempio, la barriera ematoencefalica). Nel frattempo il farmaco è sottoposto all'azione metabolica di enzimi circolanti; ma, se è capace di penetrare all'interno delle cellule, il farmaco è anche metabolizzato da enzimi intracellulari, per lo più a livello epatico. Filtrato a livello glomerulare, esso viene eliminato totalmente o in parte con le urine a seconda della sua capacità di venire riassorbito attraversando l'epitelio tubulare. È chiaro dunque che *i processi di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione sono tutti influenzati dalla capacità del farmaco di attraversare membrane cellulari.*

Le tre modalità principali per il passaggio dei farmaci attraverso barriere cellulari sono la *diffusione passiva*, i processi di *endo-esocitosi* e il *trasporto* attraverso le membrane cellulari a opera di apposite proteine (carriers, simporti, antiporti e pompe; Figure 49.2 e 49.3). Nella maggior parte dei casi, il passaggio attraverso le membrane cellulari e da un compartimento all'altro avviene per diffusione passiva.

Diffusione passiva attraverso membrane cellulari

La capacità di un farmaco di attraversare le membrane cellulari dipende dal suo coefficiente di ripartizione

La matrice delle membrane cellulari è costituita da lipidi (le code lipidiche dei fosfolipidi), mentre il citoplasma e gli spazi extracellulari sono soluzioni acquose. Per diffondere attraverso una cellula, un farmaco deve possedere un grado di idrofilia sufficiente a tenerlo in

soluzione nei liquidi acquosi extra- e intracellulari e, al tempo stesso, un grado di lipofilia (o idrofobicità) sufficiente a permettergli di distribuirsi in un ambiente lipidico quale la matrice della membrana cellulare. Possiamo misurare il grado di idro-lipofilia di un composto verificando come esso si distribuisce in un volume contenente acqua e olio: il rapporto tra le concentrazioni nella fase oleosa e acquosa è detto *coefficiente di ripartizione* (CR) della sostanza. Quando questo valore è superiore a uno, il composto è tendenzialmente lipofilo, mentre il coefficiente di ripartizione si avvicina a zero per un composto molto idrofilo.

Il coefficiente di ripartizione di una sostanza dipende dalle sue caratteristiche chimico-fisiche; conferiscono idrofilia quei gruppi che sono capaci di dare legami idrogeno con l'acqua come i gruppi carbossilici, alcolici, amminici, aldeidici e chetonici, e i gruppi elettricamente carichi. Molecole con CR molto basso vengono escluse dalla fase lipidica e quindi la loro capacità di penetrare nelle membrane cellulari e attraversarle è trascurabile (Figura 49.3A). Molecole con CR più alto sono invece in grado di attraversare liberamente le barriere cellulari; esse possono essere completamente assorbite per via orale, attraversare facilmente barriere come quella ematoencefalica o addirittura essere assorbite per via transcutanea. Infine, farmaci con CR molto elevato non diffondono facilmente attraverso le membrane perché tendono ad accumularsi nello spessore della matrice lipidica.

Il coefficiente di ripartizione di un farmaco può variare

Il coefficiente di ripartizione di un farmaco (quindi la sua capacità di attraversare le membrane cellulari) può variare per effetto dei processi di metabolizzazione. In genere questi ultimi portano alla formazione di composti più idrofili, dotati di CR inferiore a quello del farmaco originale; si noti che questo favorirà l'eliminazione renale, rendendo più difficile il riassorbimento tubulare del farmaco. Inoltre, è importante ricordare che molti farmaci contengono residui acidi o basici, ovvero gruppi che a seconda del pH della soluzione in cui si trovano possono essere elettricamente neutri oppure carichi. Per questi farmaci, il coefficiente di ripartizione dipende dal pH dell'ambiente, perché la quota ionizzata ha CR virtualmente nullo e solo la quota non ionizzata nel farmaco potrà entrare nella fase lipidica. Tale quota dipende dalla differenza tra pK_A del farmaco e pH della soluzione.

Si definisce *costante acida* di una molecola (K_A) il rapporto $[base] \cdot [H^+] / [acido]$, dove [acido] e [base] indicano le concentrazioni delle due specie della molecola. Indicando con pK_A il logaritmo negativo (base 10) di K_A , abbiamo:

$$[base] / [acido] = K_A / [H^+] = 10^{(pH - pK_A)}$$

La specie carica è generalmente la base per un acido debole, l'acido per una base debole. Pertanto il rapporto tra quota ionizzata e non per un acido debole è $[base] / [acido] = 10^{(pH - pK_A)}$ e per una base debole è $[acido] / [base] = 10^{(pK_A - pH)}$.

Una marcata differenza di pH ai lati di una membrana può determinare concentrazioni totali del farmaco molto diverse, in quanto solo la specie non ionizzata si equilibra ai due lati della membrana. Ad esempio, un acido debole come l'aspirina ($pK_A = 3$) avrà un rapporto di 0,01 tra quota ionizzata e non nel lume gastrico ($pH = 1$; $[base]/[acido] = 10^{(1-3)}$) e di 25.000 nel plasma ($pH = 7,4$; $[base]/[acido] = 10^{(7,4-3)}$). Quando l'acido si equilibra, avremo concentrazioni totali di $[0,01 \text{ (ionizzata)} + 1 \text{ (non ionizzata)}]$ sul lato luminale e $[25.000 \text{ (ionizzata)} + 1 \text{ (non ionizzata)}]$ sul lato basale delle cellule della mucosa gastrica, ovvero oltre 20.000 volte più alte che nel lume. Questo può contribuire all'azione lesiva diretta sulla mucosa gastrica.

La dipendenza del coefficiente di ripartizione dal pH della soluzione in cui si trova il farmaco può anche essere sfruttata a scopi terapeutici; ad esempio, si può accelerare l'eliminazione urinaria di un barbiturico (acido, farmaco ipnotico talvolta usato a scopo suicida), aumentandone la quota dissociata a livello tubulare; per far ciò sarà sufficiente somministrare farmaci capaci di alcalinizzare le urine (vedi Capitolo 51).

La diffusione dei farmaci segue la legge di Fick

Un farmaco dotato di un coefficiente di ripartizione adeguato può diffondere attraverso le membrane cellulari. La diffusione tra due compartimenti separati da una membrana è governata dalla *legge di Fick*:

$$\text{flusso molare} = (c_1 - c_2) D \cdot A / d$$

in cui per flusso molare si intende la velocità (moli per secondo) del passaggio di un soluto dal compartimento 1 al compartimento 2; c_1 e c_2 sono le concentrazioni del composto nei due compartimenti; D è il coefficiente di diffusione che dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche di solvente e soluto (nel caso di passaggio attraverso membrane biologiche D è principalmente determinato dal CR); A è l'area della membrana che separa i due compartimenti e d è il suo spessore. Nel caso della membrana plasmatica, d può essere considerata una costante; nel caso di un tessuto, d dipende dal numero di strati di cellule da superare (Figura 49.2). Da questa formula si traggono le seguenti deduzioni.

1. Il flusso netto di farmaco attraverso una membrana biologica che separa due compartimenti è tanto maggiore quanto maggiore è la differenza di concentrazione del farmaco nei due compartimenti; nel tempo, questo implica che il flusso si riduce a mano a mano che le concentrazioni si equilibrano. Di conseguenza, le concentrazioni seguono una *cinetica di I ordine* (vedi Capitolo 50, Box 1).
2. Farmaci differenti hanno capacità di penetrazione diversa a seconda del loro coefficiente di diffusione/ripartizione.
3. Il flusso è direttamente proporzionale all'estensione della membrana attraverso cui il farmaco diffonde; per questo motivo la maggior parte dei farmaci (o sostanze alimentari) somministrati per via orale è assorbita a livello dell'intestino tenue, dove la superficie assor-

Situazioni che ostacolano la diffusione

Basso	Spessa	Piccola	Basso
Coefficiente di ripartizione	Spessore della barriera	Superficie della barriera	Rapporto di concentrazione
Alto	Sottile	Ampia	Alto

Situazioni che facilitano la diffusione

FIGURA 49.2 Fattori che influenzano la diffusione passiva attraverso le membrane cellulari. Nella parte alta del disegno sono riportate le situazioni che ostacolano il passaggio attraverso le barriere cellulari, nella parte bassa quelle che lo facilitano.

- bente è incredibilmente estesa, e raggiunge il circolo ematico attraverso la vena porta e il fegato.
4. Il passaggio tra due compartimenti è tanto più efficiente quanto più sottile è la "barriera" da superare. Un farmaco viene assorbito (a patto che il suo CR lo permetta) più lentamente a livello cutaneo che mucoso a causa dello spessore dell'epitelio cheratinizzato e del derma; se lo stesso farmaco viene applicato su un'area cutanea lesa o disepitelizzata (spessore della barriera ridotto) l'assorbimento del farmaco può essere notevolmente più efficiente e dar luogo a effetti sistemici indesiderati.

Trasporto di farmaci attraverso membrane cellulari

Anche farmaci il cui coefficiente di ripartizione non permetterebbe in linea di principio il passaggio attraverso membrane cellulari possono di fatto attraversarle. Schematicamente, si possono distinguere quattro processi di trasporto implicati in questo fenomeno: trasporto dovuto a processi cellulari di endo-, pino- o trans-citosi, trasporto attivo contro gradiente dovuto a proteine trasportatrici o scambiatrici, passaggio mediato da trasportatori (*carrier*) di membrana, e passaggio attraverso canali o pori di membrana (Figura 49.3).

Passaggio mediato da endocitosi

Farmaci idrofili possono venire trasportati al di là di membrane e barriere cellulari attraverso un processo di *endocitosi*. In tal caso il farmaco resta di fatto in soluzione acquosa. Le vescicole possono attraversare la cellula e

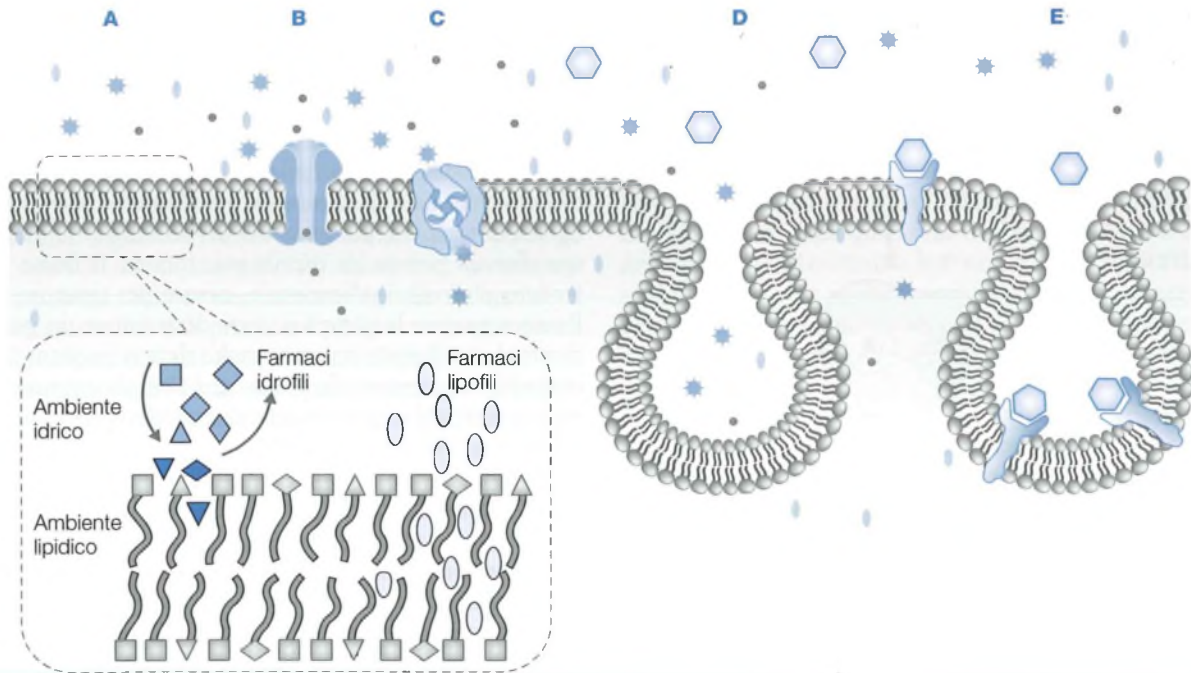


FIGURA 49.3 Meccanismi molecolari con i quali può avvenire il passaggio di farmaci attraverso la membrana plasmatica. **A.** Diffusione passiva: il passaggio è regolato dal grado di lipofilia del farmaco. **B.** Diffusione attraverso canale. **C.** Diffusione mediata da trasportatore. **D.** Endocitosi in fase fluida. **E.** Endocitosi mediata da recettore.

scaricare il loro contenuto mediante *esocitosi* sul versante opposto (processo cosiddetto di *trans-citosi* che è tipico dell'endotelio capillare); in alcuni casi le vescicole di endocitosi possono addirittura fondersi tra loro fino a generare veri e propri pori trans-cellulari attraverso i quali possono diffondere molecole di notevoli dimensioni. Il processo è particolarmente importante per quanto riguarda le proteine anioniche.

L'*endocitosi mediata da recettore* costituisce un processo con caratteristiche specifiche di notevole interesse. Molte proteine-recettore tendono ad aggregarsi, quando hanno legato il loro ligando (in alcuni casi anche spontaneamente senza ligando), e ad avviare la formazione di una struttura proteica sottomembranaria (mantello o coat), grazie all'intervento di specifiche proteine dette adattine. Il mantello, costituito dalla polimerizzazione della proteina clatrina, riveste una depressione di membrana dove i recettori sono aggregati (*coated pit*) e favorisce la formazione di una vescicola endocitotica "mantellata". Successivamente le vescicole coated perdono il mantello e si fondono a formare strutture vescicolari più grosse chiamate endosomi, il cui lume è acido (pH 5) grazie al lavoro di una pompa (ATPasi) protonica di membrana. Recettore e ligando a questo punto possono seguire destini diversi (Figura 49.4 e vedi **CD**: Approfondimento 6.2).

1. Il recettore rilascia il ligando nell'ambiente acido lisosomiale e viene riciclato alla superficie cellulare attraverso vescicole esocitotiche; il ligando viene invece trasportato ai lisosomi e degradato. Questa via è tipica dei recettori per LDL, insulina, ormone luteinizzante e altri ormoni peptidici, e permette al recettore di riciclarsi anche decine di volte senza venir degradato.

2. Recettore e ligando possono venire entrambi riciclati alla superficie. Questa via è seguita dalla transferrina e del suo recettore: la transferrina ha alta affinità per il suo recettore, presente su tutte le cellule, quando è complessata con ioni Fe^{3+} ; raggiunto l'endosoma legata al recettore, a causa del pH acido endosomiale rilascia gli ioni Fe^{3+} che ha legato e che possono così venire utilizzati dalla cellula. Quando il complesso transferrina-recettore ritorna alla superficie cellulare, esso si dissocia in quanto la transferrina privata degli ioni Fe^{3+} ha scarsa affinità per il suo recettore al pH neutro extracellulare. Essa ritorna così in circolo per catturare nuovi ioni Fe^{3+} a livello epatico ed intestinale; il recettore cellulare è invece di nuovo pronto a legare una nuova molecola di transferrina trasportante ferro. Questo meccanismo consente all'organismo di distribuire alle cellule gli ioni Fe^{3+} presenti a livello epatico e intestinale. Gli ioni liberi non potrebbero venire distribuiti perché tendono a dar luogo, a pH neutro, a idrossido ferrico insolubile.

3. Recettore e ligando possono venire entrambi degradati. Questa via è stata descritta per il fattore di crescita epidermico (*Epidermal Growth Factor*, EGF); alcune azioni dell'EGF vengono esplicate durante il tragitto intracellulare.

4. In cellule polarizzate, recettore e ligando possono venire trasportati nella vescicola fino alla membrana cellulare sul versante opposto e qui venire esocitati; il processo è stato descritto per le IgA e le IgM, che vengono escrete dall'epatocita nella bile e dalle cellule epiteliali mammarie nel latte, e per le IgG a livello placentare.

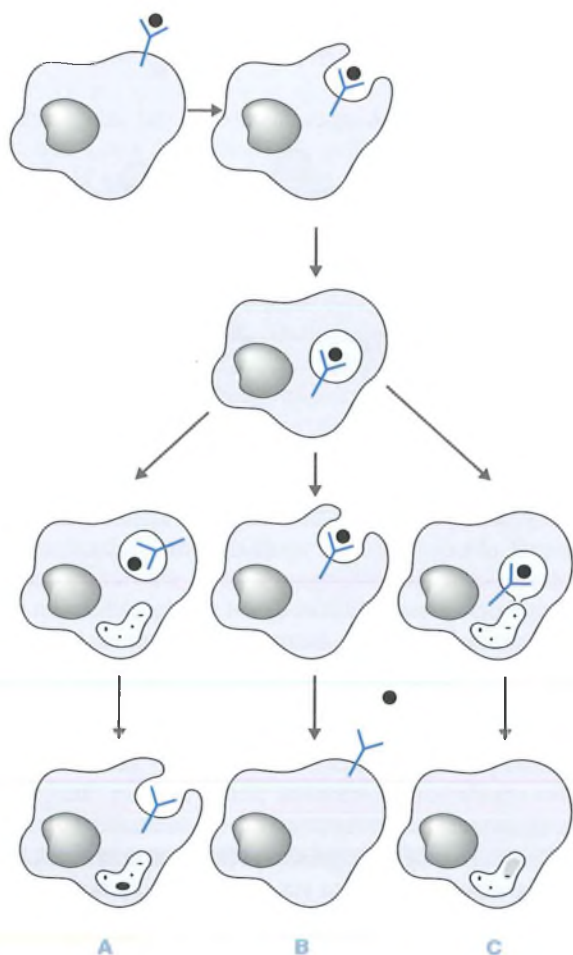


FIGURA 49.4 Possibili destini del recettore e del suo ligando una volta interiorizzato. **A.** Il ligando viene confinato nel sistema endolisosomiale mentre il recettore ricicla alla superficie; è questo il caso del recettore per le LDL. **B.** Sia il recettore che il ligando vengono riportati alla superficie; è questo il caso del recettore per la transferrina che, durante il tragitto, a sua volta trasporta ioni ferro. **C.** Sia il recettore che il ligando sono degradati a livello lisosomiale; questo avviene per il recettore dell'EGF.

Le caratteristiche cinetiche dei processi di endocitosi mediata da recettore sono simili a quelle dei trasporti attivi (specificità, consumo di energia, trasporto limitato dal numero di siti di legame); il processo è però più versatile e permette l'ingresso nelle cellule e il passaggio di molecole di dimensione notevole; inoltre, la diversa dotazione di recettori nelle varie popolazioni cellulari apre l'affascinante possibilità di sfruttare i meccanismi di endocitosi mediata da recettore per indirizzare farmaci specificamente a determinate cellule.

Trasporto attivo contro gradiente elettrochimico

Il trasporto di farmaci da parte di scambiatori/contrasportatori (antiporti e simporti) o di pompe di membrana segue le regole specifiche di tali meccanismi di trasporto (vedi Capitolo 23). La principale caratteristica di questi meccanismi è che il trasporto di un soluto può avvenire

anche contro gradiente elettrochimico, in quanto il trasporto è accoppiato a un altro processo in grado di fornire l'energia necessaria. Pertanto il flusso è in questi casi solo in parte determinato dalla differenza di concentrazione del farmaco; il trasporto è saturabile e il trasporto massimo è determinato dalla densità del trasportatore sulla membrana e dalla *turnover rate* (numero massimo di cicli di trasporto per molecola per secondo). Nel caso specifico di pompe di membrana, inoltre, il flusso è tendenzialmente unidirezionale, ovvero per invertire il flusso attraverso la pompa occorre determinare un gradiente elettrochimico contrario molto elevato, in quanto il trasporto è accoppiato alla idrolisi di ATP e per invertire il ciclo occorrerebbe un potenziale elettrochimico superiore alla energia liberata da tale idrolisi.

Va considerato che le pompe di membrana e i sistemi di cotrasporto/antiporto possono certo agire permettendo al farmaco di raggiungere il suo sito di azione, ma possono anche svolgere una azione opposta. Farmaci che agiscono all'interno di cellule – questo è il caso di molti chemioterapici che devono penetrare, ad esempio, nella cellula tumorale per esercitare la loro azione citotossica – possono essere soggetti a una estrusione attiva da parte di sistemi di cotrasporto e di pompe ATPasiche (principalmente appartenenti alla famiglia delle pompe "ABC cassette"), destinati appunto alla estrusione di sostanze esogene: all'insieme di questi meccanismi ci si riferisce con il termine generale di *Multi-Drug Resistance* (MDR), in quanto, grazie alla estrusione attiva dei farmaci molte cellule tumorali divengono resistenti alla loro azione. Analogamente, alcuni tipi cellulari neoplastici possono sovraesprimere enzimi detossificanti in grado di metabolizzare e inattivare farmaci antitumorali. In molti casi, sono stati studiati e sperimentati interventi collaterali che, alterando le concentrazioni intracellulari, e quindi i gradienti ionici, o interferendo con la funzione delle pompe ATPasiche o degli enzimi detossificanti, ostacolano l'insorgenza di questo meccanismo di resistenza e aprono prospettive interessanti per aumentare l'efficienza dell'intervento chemioterapico.

Trasportatori e diffusione facilitata

Una situazione leggermente diversa caratterizza il passaggio di farmaci attraverso *trasportatori* o *carrier*, proteine di membrana capaci di esporre certi siti alternativamente sull'una o sull'altra delle superfici della membrana. Ioni o molecole cariche possono legarsi a tali siti in modo tale che il complesso, mascherando i gruppi polari, può attraversare la membrana e rilasciare il soluto carico dall'altra parte. I trasportatori sono solitamente caratterizzati da una elevata selettività. Alcune sostanze esogene, come l'antibiotico valinomicina, sono capaci di inserirsi in membrane biologiche e operare essi stessi come trasportatori (selettivo per il potassio, nel caso della valinomicina). Il flusso del farmaco che attraversa la membrana grazie alla presenza di un trasportatore rispetta, a basse concentrazioni di farmaco, le leggi della diffusione. L'importante differenza rispetto alla diffusione passiva è che

il flusso per mezzo di trasportatori è saturabile; infatti, se ogni molecola di trasportatore esegue un ciclo in T secondi, e vi sono N molecole per μm^2 di membrana, può essere trasportato un massimo di N/T molecole per μm^2 di membrana per secondo. Quindi, al di sopra di una concentrazione critica del farmaco, il flusso cessa di dipendere dalle concentrazioni del farmaco e diventa costante (uguale al trasporto massimo); questo dà luogo a cinetiche miste che sono di ordine zero (ovvero indipendenti dalla concentrazione) ad alte differenze di concentrazione e di primo ordine (ovvero proporzionali alla concentrazione) a concentrazioni più basse.

Una molecola di trasportatore può permettere il passaggio di diverse migliaia di ioni per secondo, a differenza dei canali di membrana che permettono il passaggio di milioni di ioni per secondo. Anche per i trasportatori, comunque, il farmaco non può che muoversi secondo il suo gradiente elettrochimico, e spesso ci si riferisce a questo processo di trasporto come diffusione facilitata.

Passaggio attraverso canali di membrana

Molecole che normalmente non potrebbero attraversare una membrana lipidica (ad esempio, ioni, ma anche farmaci idrofili o carichi) possono di fatto attraversarla restando idratate e in soluzione acquosa attraverso pori o canali idrofili della membrana. Tali pori sono costituiti da proteine transmembrinarie presenti sulle varie membrane biologiche, che sono in grado di generare al loro interno, a seguito di transizioni conformazionali, un "poro" idrofilo, ovvero una cavità virtuale nella quale sono esposti residui amminoacidici carichi e che mette in comunicazione i due compartimenti acquosi ai lati della membrana. I soluti carichi sono caratterizzati dalla presenza di un "alone di idratazione", ovvero di un certo numero di molecole d'acqua legate ai gruppi carichi da ponti idrogeno, che si muovono solidalmente alla molecola del soluto. Nella cavità virtuale presente in un poro di membrana "aperto" può stabilirsi un ambiente acquoso (un vero e proprio canale) che permette il passaggio di ioni e molecole polarizzate, oppure può crearsi la situazione adatta per la penetrazione di specifici ioni o molecole polarizzate private del loro alone di idratazione. In entrambi i casi, il passaggio del farmaco è sottoposto alle leggi della diffusione, ovvero attraverso la membrana con velocità proporzionale al suo coefficiente di diffusione e all'area di sezione e al numero dei pori. Ciò che è più importante è che il farmaco si muove secondo il suo gradiente elettrochimico: il flusso netto di farmaco è proporzionale alla differenza di concentrazione ai lati della membrana e, se si tratta di molecole cariche, è influenzato dal potenziale di membrana. A seconda dei gruppi carichi esposti nel poro, la proteina canale può mostrare selettività in funzione della sola dimensione della molecola idratata, oppure lasciar passare solo cationi o anioni, o addirittura una sola particolare specie ionica. Alcuni antibiotici, come la gramicidina, sono in grado di inserirsi in membrane biologiche formando canali di membrana (con selettività per i cationi nel caso della gramicidina).

Diffusione dei farmaci a organi e tessuti

Si è visto che il passaggio del farmaco da un compartimento all'altro può avvenire per diffusione passiva o a seguito di trasporti facilitati o attivi. A seconda dei casi, la velocità di passaggio è determinata dalla legge di Fick (ovvero dalla differenza di concentrazione e da area/spessore dell'eventuale barriera) o dalla densità dei sistemi di trasporto; ad alte concentrazioni, se il passaggio del farmaco è mediato da sistemi di trasporto (carrier, cotrasporti, pompe) la velocità può essere limitata da processi di saturazione.

Considerando il passaggio di farmaco a uno specifico organo o tessuto, un altro fattore importante entra in gioco. Se immaginiamo di introdurre un colorante in un sistema di tubi e serbatoi pieno d'acqua che circola, è facile immaginare che il colorante diffonderà più rapidamente ai serbatoi collegati con tubi più grossi (ovvero per i quali il flusso è più elevato), e, inoltre, si equilibrerà più rapidamente, a parità di flusso, nei serbatoi più piccoli. Il parametro cruciale è di fatto il rapporto tra flusso e volume, detto *flusso specifico*. La velocità con cui ogni serbatoio raggiunge l'equilibrio è data dal flusso specifico, e la costante di tempo del processo di diffusione per ogni serbatoio è uguale al rapporto volume/flusso ($\text{ml} / [\text{ml}/\text{min}] = \text{minuti}$). Analogamente, ogni organo/tessuto si dovrebbe equilibrare con il plasma con velocità proporzionale al flusso specifico (espresso ad esempio in litri di plasma per grammo di tessuto per minuto). Si noti che il volume da considerare non è propriamente il volume dell'organo/tessuto in esame, bensì – come sarà illustrato nel Capitolo 51 – il suo *volume di distribuzione apparente*. Da quanto detto emerge una contraddizione: da un lato si dovrebbe concludere che un organo/tessuto si equilibra con il plasma con velocità proporzionale alla permeabilità delle barriere cellulari che lo separano dal plasma, mentre d'altro canto si dovrebbe pensare che il flusso specifico debba essere determinante. In realtà vale la regola che tra diversi fattori limitanti domina il più restrittivo. Il plasma che raggiunge il tessuto rilascia il farmaco al tessuto stesso con velocità che dipende dalla permeabilità delle barriere cellulari e dalla efficienza dei sistemi di trasporto; nella migliore delle ipotesi, comunque, il plasma che arriva al tessuto potrà rilasciare solo la quantità di farmaco che lo porta in equilibrio con il tessuto stesso. Di conseguenza la velocità con cui tessuto e plasma si equilibrano non potrà essere superiore al flusso specifico (litri di plasma per minuto per litro di tessuto) che diviene il fattore limitante. Per fare un esempio, un farmaco non molto lipofilo, come il β -bloccante atenololo, raggiungerà con difficoltà e lentezza il SNC, a causa della lenta diffusione attraverso la barriera ematoencefalica (vedi oltre), mentre potrà distribuirsi più rapidamente ad altri tessuti come quello muscolare e cardiaco; viceversa la distribuzione di un farmaco molto lipofilo come il barbiturico pentothal, che diffonde benissimo attraverso la barriera ematoencefalica, sarà limitata dalla perfusione specifica, e il farmaco raggiungerà concentrazioni elevate nel cer-

vello, tessuto ad altissimo flusso specifico, prima che nelle masse muscolari o in altri tessuti. Per una trattazione più completa di questi aspetti, vedi Capitolo 51.

Gli aspetti cruciali che determinano le modalità con cui la maggior parte dei farmaci (dei soluti in generale) si distribuisce in compartimenti diversi sono i seguenti (vedi anche Figura 49.2).

- ▶ Il flusso netto di un farmaco attraverso una barriera che separa due compartimenti è proporzionale alla superficie della barriera.
- ▶ Il flusso è inversamente proporzionale allo spessore della barriera (ad esempio, più strati di cellule).
- ▶ Il flusso è proporzionale alla densità di pori o molecole di trasportatore o alla intensità dell'attività endocitotica, quando questi processi contribuiscono al passaggio del farmaco.
- ▶ Il flusso è proporzionale alla differenza di concentrazione del farmaco ai due lati della barriera. Questo è vero quando sono predominanti i processi di diffusione (passaggio attraverso la matrice lipidica della membrana o attraverso pori) e anche in presenza di processi attivi, a concentrazioni di farmaco ben sotto quelle saturanti. Il flusso diventa invece indipendente dalle concentrazioni del farmaco quando queste sono tali da saturare i processi di trasporto attivo (pompe, endo-esocitosi ecc.).
- ▶ In generale la velocità con cui la concentrazione di un soluto tende a equilibrarsi tra più compartimenti è proporzionale al rapporto tra quantità di farmaco che cambia compartimento ogni secondo e il volume dei compartimenti interessati.
- ▶ La velocità con cui la concentrazione di un soluto in un compartimento si equilibra con quella plasmatica, se non è limitata dai processi di diffusione/trasporto, è uguale alla perfusione specifica del compartimento, ovvero al rapporto tra flusso ematico e volume dell'organo o del tessuto.

È pertanto importante esaminare le caratteristiche strutturali e funzionali delle principali barriere cellulari che nell'organismo separano i vari compartimenti. Tali caratteristiche determinano infatti non solo l'efficienza e la velocità con cui i farmaci possono raggiungere i vari compartimenti, ma anche il grado di selettività della barriera in funzione delle caratteristiche fisico-chimiche dei diversi farmaci e della presenza di meccanismi selettivi di traslocazione.

Caratteristiche delle principali barriere cellulari

L'endotelio capillare è una barriera molto labile per composti a basso peso molecolare

L'endotelio capillare costituisce una barriera cellulare molto labile in quanto caratterizzata da spessore limitato, alta attività di endo-esocitosi e trans-citosi, e presenza di *fenestrate* e pori membranari. La ricchezza della irro-

razione capillare (da 50 capillari per mm^2 nella cute a 2000 nel miocardio) rende disponibile una estesissima superficie di scambio, che permette una rapida diffusione della maggior parte dei farmaci dal letto capillare ai liquidi interstiziali.

Per molecole idrofiliche e polarizzate il passaggio avviene attraverso i pori e il fattore determinante è quindi la *dimensione molecolare* del farmaco. I pori rappresentano una frazione limitata della superficie endoteliale (solo lo 0,2% per le molecole più piccole come l'acqua), sono in parte localizzati a livello delle giunzioni tra cellule endoteliali adiacenti e in parte coincidenti con le regioni descritte come *fenestrate* nelle cellule endoteliali. Il loro diametro molecolare, valutato intorno ai 10 nm, limita drasticamente il passaggio di molecole con peso molecolare superiore a 60.000 Da (corrispondente a quello dell'albumina).

Per molecole liposolubili capaci di diffondere attraverso le membrane cellulari (compresi i gas disciolti nel sangue come ossigeno, azoto, anidride carbonica e i gas anestetici), la rapidità della diffusione è determinata principalmente dal coefficiente di ripartizione.

In conseguenza di quanto detto sopra:

- ▶ solo le molecole di farmaco libere in soluzione sono capaci di attraversare la barriera endoteliale; stati di aggregazione o legame del farmaco a proteine plasmatiche (vedi oltre) riducono drasticamente la velocità con cui il farmaco lascia il circolo (si noti che questo principio può essere sfruttato per regolare la disponibilità del farmaco attraverso formulazioni chimiche particolari (vedi Capitolo 50, paragrafo Drug delivery);
- ▶ variazioni dell'organizzazione morfo-funzionale dell'endotelio capillare (ad esempio, nel corso di processi flogistici) possono influenzare la velocità di diffusione dei farmaci dal letto vascolare ai liquidi interstiziali in determinati distretti.

La permeabilità è diversa nei vari distretti capillari

Le caratteristiche di permeabilità capillare non sono identiche nei vari organi, sia per differenze di spessore delle cellule endoteliali, sia per diversa dotazione di pori (Figura 49.5). L'endotelio dei glomeruli renali, ad esempio, ha una permeabilità particolarmente elevata; i capillari dei sinusoidi epatici, privi di lamina basale e di un rivestimento endoteliale continuo, consentono il passaggio anche di proteine plasmatiche. L'endotelio dei capillari cerebrali è invece particolarmente impermeabile e costituisce la cosiddetta barriera ematoencefalica.

Le caratteristiche di permeabilità dell'endotelio capillare sono modulabili da condizioni fisiopatologiche e da farmaci (ad esempio, l'istamina produce un aumento della permeabilità capillare). La velocità con cui il farmaco raggiunge gli spazi interstiziali di un determinato distretto tessutale è influenzata non solo da variazioni di permeabilità ma anche da variazioni della perfusione del letto capillare (ad esempio, per costrizione arteriolare).

La barriera ematoencefalica limita l'accesso dei farmaci idrofili al SNC

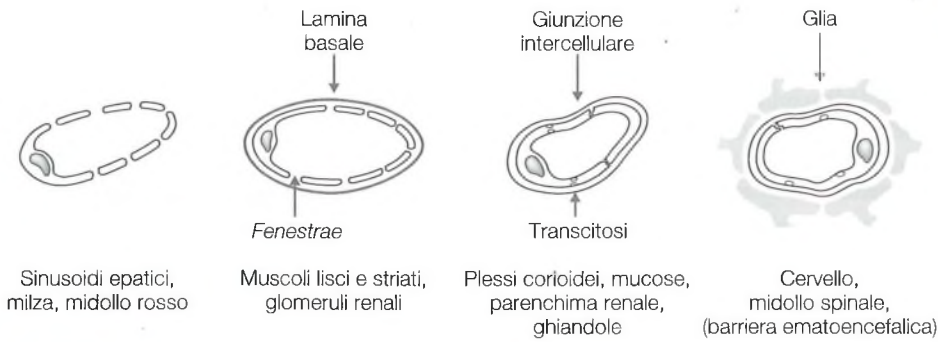


FIGURA 49.5 I capillari sanguigni hanno un'organizzazione morfo-funzionale diversa a seconda della sede in cui si trovano. Ciò fa sì che la permeabilità del letto vascolare a un certo farmaco possa essere diversa a seconda del distretto irrorato.

Permeabilità capillare

I farmaci possono giungere alle cellule del sistema nervoso centrale (SNC) per due vie: dal sangue o dal liquido cefalorachidiano. In entrambi i casi le barriere cellulari che devono essere superate sono notevolmente più efficienti e selettive del normale endotelio capillare (Figura 49.6). I capillari encefalici sono caratterizzati da scarsissima attività eso-, endo- e trans-citotica, dalla virtuale assenza dei pori di grosso diametro che caratterizzano l'endotelio capillare normale e dalla presenza di un rivestimento quasi continuo di cellule gliali (Figura 49.5). A causa di questa peculiare organizzazione morfologica del micro-

circolo cerebrale, la composizione del liquido interstiziale nel sistema nervoso centrale è notevolmente diversa da quella di altri compartimenti tissutali ed è caratterizzata dalla virtuale assenza di proteine plasmatiche.

Solo farmaci con un elevato coefficiente di ripartizione (alta liposolubilità) sono in grado di penetrare efficientemente nel SNC e di esercitare la loro azione sui neuroni centrali. Tali farmaci lipofili penetrano nel SNC con grande rapidità, dato l'elevatissimo indice di perfusione dell'encefalo (in media 0,5 ml/min per grammo di tessuto, cioè circa 10 volte più alto che nel muscolo a

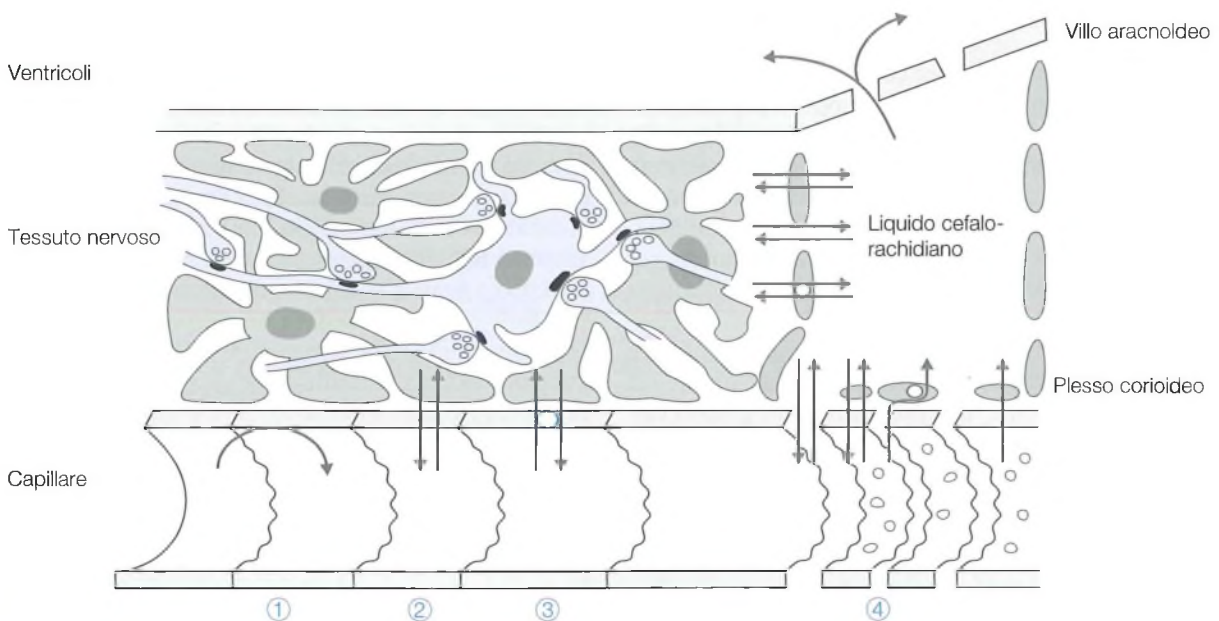


FIGURA 49.6 Rappresentazione schematica della barriera ematoencefalica. Il liquido interstiziale che circonda le cellule nervose del cervello è in equilibrio con il liquido cefalorachidiano, caratterizzato dalla virtuale assenza di proteine di origine ematica. L'endotelio dei vasi cerebrali ha caratteristiche morfologiche e funzionali che realizzano la barriera ematoencefalica: questa impedisce l'ingresso nel liquido interstiziale cerebrale di qualunque sostanza incapace di diffondere liberamente attraverso le membrane (1). Nel SNC possono quindi penetrare solo farmaci con adeguato coefficiente di ripartizione (2) o capaci di utilizzare i sistemi di trasporto presenti a livello della barriera ematoencefalica (3). Lo stato di impermeabilità è ridotto a livello dei plessi corioidei (4) e di altre regioni periventricolari (eminenza mediana, area postrema del IV ventricolo) dove hanno normalmente luogo i processi di filtrazione e secrezione che controllano la formazione del liquido cefalo-rachidiano. La scarsa efficienza della barriera a questo livello rende alcune zone, come la *chemoreceptor trigger zone*, più sensibili di altre aree del SNC all'azione di farmaci.

riposo, e addirittura più di 1,3 ml/min per grammo di materia grigia cerebrale). Inoltre, data l'alta quantità di lipidi dovuta all'abbondanza di membrane cellulari e di guaine mieliniche, i farmaci lipofili tendono anche ad accumularsi in alta concentrazione nel tessuto nervoso, soprattutto nella materia bianca.

I farmaci idrofili non penetrano in misura significativa nel sistema nervoso centrale; essi sono perciò praticamente privi di effetti centrali a meno che non vengano somministrati direttamente nel liquido cefalorachidiano (LCR), eventualità molto infrequente, o che vi sia una compromissione funzionale della barriera ematoencefalica. Tale possibilità va considerata in soggetti anziani (nei quali l'insulto aterosclerotico può compromettere l'efficienza della parete capillare) e in presenza di stati infiammatori a carico delle strutture encefaliche e meningee o di stati febbrili elevati, specialmente nei bambini.

In generale, la penetrazione di un farmaco nel SNC è fortemente influenzata da:

- ▶ legame alle proteine plasmatiche, in quanto solo la quota libera può diffondere attraverso la barriera ematoencefalica o nel liquor;
- ▶ grado di ionizzazione, in quanto la quota ionizzata è virtualmente esclusa dal SNC;
- ▶ coefficiente di ripartizione (per la quota non ionizzata).

Vale la pena di ricordare che il CR di per sé non consente di prevedere il grado di penetrazione di un farmaco nel SNC; tuttavia, tra farmaci a struttura chimica simile, attraversano più facilmente la barriera ematoencefalica quelli che hanno il CR più alto.

A livello della barriera ematoencefalica esistono anche sistemi di trasporto attivo che consentono la penetrazione nel SNC di amminoacidi, glucosio e piccoli peptidi a tirosina N-terminale (quali le encefaline); inoltre, polipeptidi, quali insulina, fattori di crescita e transferrina, vengono trasportati da meccanismi di endocitosi mediata da recettore. I meccanismi di trasporto possono essere sfruttati, ad esempio, nella terapia della malattia di Parkinson, per fornire alle cellule dopaminergiche della substantia nigra l'amminoacido L-DOPA (di-idrossifenilalanina), precursore del trasmettitore dopamina: entrambe le sostanze sono idrofile e non possono penetrare passivamente nel SNC, ma la L-DOPA, pur possedendo un gruppo carbossilico in più ed essendo pertanto ancor più idrofila, è un amminoacido e come tale viene attivamente catturato dal trasportatore degli amminoacidi e trasferito al tessuto nervoso encefalico.

Oltre che dal circolo capillare, i farmaci possono giungere alle cellule nervose dal LCR. Questo deriva in parte dal drenaggio del liquido interstiziale cerebrale e in parte viene prodotto a livello dei plessi corioidei e di altre strutture circaventricolari grazie a un processo di ultrafiltrazione. A livello dei plessi, l'endotelio è fenestrato e molto più permeabile di quanto non sia altrove nel SNC; tuttavia, data la sua bassa estensione (circa 5000 volte inferiore a quella del microcircolo capillare encefalico), il passaggio di farmaci idrofili nel SNC rimane comunque limitato. Grazie alle profonde convoluzioni della superficie cere-

brale, tutte le cellule nervose si trovano entro una distanza di circa 1 cm dal LCR; tale distanza è comunque troppo elevata per permettere una significativa penetrazione diffusionale dei soluti idrofili. Farmaci somministrati per via intratecale raggiungono solo gli strati sottomeningei del tessuto cerebrale.

Altri due fattori contribuiscono a ridurre la penetrazione di farmaci al tessuto nervoso encefalico attraverso il LCR. Innanzitutto, poiché LCR refluisce nel sangue venoso attraverso i seni dei villi aracnoidei, i farmaci possono venire restituiti al circolo ematico prima ancora che facciano in tempo a equilibrarsi con il liquido interstiziale cerebrale; inoltre è presente un sistema di trasporto attivo di acidi organici (dal LCR al sangue), simile a quello epatico e tubulare renale, che rapidamente elimina dal liquor (e quindi dal tessuto nervoso) farmaci che sono acidi organici (ad esempio, le penicilline). Tuttavia l'efficienza del sistema di trasporto può essere compromessa in corso di meningiti e la penicillina può, in questi casi, raggiungere concentrazioni efficaci nel SNC.

È importante ricordare che le zone del SNC localizzate nelle vicinanze dei plessi corioidei e alcune regioni periventricolari (ad esempio, la *chemoreceptor trigger zone*, l'eminenza mediana, parte dell'ipofisi) sono generalmente considerate meno protette dalla barriera ematoencefalica e più sensibili all'azione dei farmaci.

La "barriera" placentare è meno impermeabile di quella cerebrale

La placenta è caratterizzata dalla presenza di seni ematici materni nei quali si spingono i villi irrorati dalla circolazione capillare fetale. Il sangue fetale è separato pertanto da quello materno dal sincizio placentare, dall'interstizio villare e dalle cellule endoteliali dei capillari villari. Il sincizio placentare costituisce un filtro molecolare nel quale sono particolarmente attivi tutti i meccanismi di passaggio discussi in precedenza, oltre alla diffusione passiva, la diffusione facilitata (per glucosio), i trasporti attivi (per amminoacidi, che raggiungono concentrazioni più alte nel circolo fetale che nel sangue materno, e per calcio e fosfato), endocitosi mediata da recettore (molto attiva per transferrina, IgG e altri peptidi e proteine materne). Dal punto di vista della diffusione passiva, come nel caso del passaggio attraverso la barriera ematoencefalica, il passaggio dal sangue materno a quello fetale (e viceversa) è dipendente dal coefficiente di ripartizione del farmaco, dalla differenza di concentrazione tra sangue materno e interstizio/sangue fetale e dal legame alle proteine plasmatiche. È da osservare che lo spessore degli strati tissutali interposti tra sangue fetale e materno è di circa 25 μm all'inizio della gestazione e di soli 2 μm a termine. La barriera placentare esercita una azione di filtrazione selettiva sostanzialmente diversa dalla barriera ematoencefalica: innanzitutto manca l'impermeabilità quasi assoluta riscontrata nella circolazione capillare cerebrale e farmaci con un discreto grado di idrofilia possono passare al circolo fetale, con velocità inversamente proporzionale alle dimensioni molecolari. Inoltre, poiché il sangue materno fluisce molto lentamente, aumenta

il tempo disponibile perché le molecole di farmaco possano attraversare il sincizio ed entrare nella circolazione fetale. Ne consegue che il passaggio di farmaci dalla madre al feto può essere considerato trascurabile solo per quei farmaci idrofili che siano di dimensioni molecolari grosse, che siano presenti in concentrazione relativamente bassa e che vengano eliminati rapidamente dal circolo materno.

Le cinetiche di equilibrio sono in generale lente a questo livello. A ciò contribuisce anche il legame alle proteine plasmatiche fetali. In altri compartimenti il liquido interstiziale è virtualmente privo di proteine che leghino i farmaci e la concentrazione del farmaco si equilibra rapidamente con la quota libera plasmatica; a livello fetale, invece, le proteine plasmatiche possono legare parte del farmaco rallentando la salita della concentrazione libera verso l'equilibrio con il plasma materno. In altre parole le proteine plasmatiche fetali aumentano il volume di distribuzione apparente del feto e pertanto rallentano le cinetiche di equilibrio, la cui velocità è proporzionale al rapporto flusso/volume (vedi anche Capitolo 53: Paragrafo Cinetiche di equilibrio tra più compartimenti).

Un caso particolare è costituito dal momento del travaglio e del parto, nel quale il bambino può presentare una marcata acidosi. Nel caso di barbiturici iniettati per anestesia alla madre, l'accumulo di farmaco può essere importante e, associato alle ridotte capacità di metabolizzazione neonatali, portare a uno stato di sedazione persistente anche per 12-24 ore.

In conclusione, è buona norma considerare che qualunque farmaco somministrato in gravidanza raggiungerà, seppure lentamente e spesso in concentrazioni più basse, anche il feto; i dati disponibili indicano che nei casi più rapidi l'equilibrio madre-feto richiede almeno 40 minuti. Per sostanze idrosolubili, di grosse dimensioni, ionizzate o legate significativamente alle proteine plasmatiche l'equilibrio può richiedere ore. In quest'ultimo caso e se il farmaco è rapidamente eliminato dal circolo materno, è possibile somministrare dosi terapeutiche per la madre senza produrre effetti significativi nel feto.

Va ricordato che considerazioni analoghe valgono per il puerperio e l'allattamento: praticamente tutti i composti presenti in concentrazione significativa nel sangue materno si ritrovano anche nel latte.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Per esercitare il suo effetto, il farmaco deve raggiungere una concentrazione adeguata sul sito sul quale deve agire.
- ▶ A seconda di come viene somministrato, il farmaco deve superare epiteli, endoteli e altre barriere cellulari per raggiungere il bersaglio. Nel frattempo il farmaco può venire metabolizzato ed escreto.
- ▶ In questi passaggi è cruciale la struttura chimica del farmaco, perché il suo grado di lipofilia determina la facilità con cui può attraversare membrane cellulari; esistono numerosi meccanismi e sistemi di trasporto (passivi e attivi) grazie ai quali anche i farmaci non lipofili possono muoversi attraverso le barriere cellulari che separano i diversi compartimenti dell'organismo.
- ▶ I processi di diffusione determinano andamenti temporali specifici della concentrazione del farmaco nei vari compartimenti dell'organismo e di conseguenza della sua azione sul suo bersaglio: ciò costituisce l'oggetto di studio della farmacocinetica.

Bibliografia essenziale

- ▶ Birkett DJ. Pharmacokinetic Made Easy. New York: McGraw-Hill Publishing Co, 2003.
- ▶ Clark RD, Wolohan PR. Molecular design and bioavailability. Curr Top Med Chem 2003;3:1269-88.
- ▶ Whashington N, Washington C, Wilson CG. Physiological pharmaceuticals: Barriers to Drug Absorption. London: CRC Press, 2001.
- ▶ Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. Pharmacol Rev 2003;55:425-61.



Assorbimento e vie di somministrazione dei farmaci

CAPITOLO

50

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

Obiettivi formativi

- Comprendere la rilevanza dei processi di assorbimento per la disponibilità del farmaco sul sito d'azione
- Conoscere le diverse vie di somministrazione e le relative caratteristiche, in termini di velocità di assorbimento, passaggio al circolo sistemico, tempi e valori di picco di concentrazione plasmatica e criteri di scelta
- Comprendere le diverse modalità con cui la preparazione farmaceutica permette di indirizzare il farmaco su specifici bersagli cellulari (drug delivery)

L'assorbimento è l'insieme di processi attivi e passivi che consentono il passaggio di un farmaco dal suo sito di somministrazione alla circolazione sistemica (o all'interstizio regionale nel caso di somministrazione topica). Le principali vie di somministrazione *sistemica* possono essere classificate come *enterali* o *parenterali*. A esse si affiancano svariate altre modalità di somministrazione topica o regionale (talora utilizzate anche come sistemiche). Per l'una o l'altra di queste vie, è inoltre possibile preparare i farmaci in modo da regolarne l'assorbimento (nel tempo, o a seconda di condizioni specifiche) o indirizzarne la "consegna" verso organi o tessuti specifici: questi aspetti costituiscono la moderna e dinamica disciplina della "drug delivery", trattata alla fine del capitolo.

Le diverse modalità di somministrazione sono elencate nella tabella 50.1.

Come si può notare dalla tabella, la distinzione tra vie sistemiche e topiche non è assoluta: infatti una stessa via può essere utilizzata con intenzione di ottenere significativi livelli di farmaco in tutto il circolo (uso sistemico) o per ottenere concentrazioni terapeutiche locali senza indurre rilevanti effetti sistemiche (uso topico). Ad esempio, la somministrazione per via sottocutanea è generalmente impiegata per ottenere una diffusione in circolo lenta ed efficace di farmaci non assorbibili per via orale (ad esempio, insulina), ma può essere utilizzata anche per ottenere effetti principalmente locali, come nel caso dell'anestesia locale. La via transcutanea (applicazione diretta sulla cute) è, al contrario, per lo più utilizzata per uso topico (cura di infezioni e lesioni cutanee in genere); ma per le caratteristiche del tessuto, questa via può essere sfruttata per ottenere un assorbimento lento e costante di farmaci

che passano facilmente le membrane, come con i cerotti dermici utilizzati nella cinetosi o nella terapia preventiva dell'angina pectoris con nitrati organici.

La scelta della via di somministrazione deve tenere conto delle caratteristiche fisico-chimiche del farmaco e della strategia terapeutica utilizzata: per ottenere effetti sistemiche, un farmaco molto idrofilo (poco assorbito a livello gastroenterico) dovrà essere somministrato per via parenterale; all'opposto, un farmaco che passa facilmente le membrane, anche se impiegato per uso topico potrà essere assorbito in quantità significative e dar luogo a effetti sistemiche.

La via attraverso cui il farmaco è somministrato influenza molto i livelli plasmatici massimi ottenibili, la rapidità di insorgenza dell'effetto e, in molti casi, anche la sua durata. Una rapida somministrazione endovenosa può

TABELLA 50.1 Vie di somministrazione dei farmaci

Vie enterali	Orale, sublinguale o buccale, rettale	(per os)
Vie parenterali sistemiche	Intravascolare	Endovenosa (ev), intracardiaca e intrarteriosa (somministrazione regionale)
	Intramuscolare	(im)
	Cutanea	Sottocutanea (sc) e intradermica (anche topica)
Altre vie	D'organo	Intratecale, intrarticolare e inalatoria (topica, inalatoria anche sistemica)
	Intracavitaria	Intraperitoneale, intrapleurica
	Transcutanea	Principalmente topica ma anche regionale o sistemica
	Transmucosale	Oculare, vaginale ecc.

generare effetti indesiderati, che potrebbero mancare quando la stessa dose del farmaco è somministrata per via intramuscolare o enterale. Sono oggi disponibili anche formulazioni studiate per rilasciare i farmaci con particolari cinetiche (lente, multifasiche) e/o selettivamente in particolari situazioni, tessuti o organi. Ci si riferisce a questa problematica con il termine di "drug delivery". Infine la scelta della via di somministrazione può essere influenzata da considerazioni di ordine pratico e psicologico: una terapia cronica dovrà, quando possibile, utilizzare la via meno traumatica per il paziente (per os), mentre la via parenterale sarà quella di scelta in pazienti non "collaborativi" (pazienti comatosi, neonati). Importante è anche l'aspetto psicologico legato alle varie vie di somministrazione: ad esempio molti pazienti seguono più accuratamente le indicazioni di posologia e durata della terapia date dal medico se il farmaco è somministrato "per iniezione".

Regole generali sulla velocità di assorbimento dei farmaci

A esclusione della somministrazione direttamente nel circolo sanguigno, tutte le altre vie richiedono che, per giungere dalla sede di somministrazione al sangue, il farmaco attraversi un numero variabile di cellule e/o membrane cellulari e diffonda in spazi intercellulari di dimensioni e composizione diverse.

Nella tabella 50.2 sono elencate le variabili che possono influenzare la velocità con cui un farmaco è assorbito, a seconda della via di somministrazione utilizzata; alcune di queste variabili riguardano le caratteristiche fisico-chimiche dei farmaci stessi, altre le proprietà dei tessuti attraverso i quali i farmaci sono assorbiti.

Coefficiente di ripartizione

Il coefficiente di ripartizione olio-acqua (CR) è stato discusso esaminando il problema del passaggio delle membrane cellulari (vedi Capitolo 49). Si tratta di un parametro molto importante per l'assorbimento attraverso quelle vie (enterica, transcutanea, inalatoria ecc.) che prevedono la presenza di barriere cellulari (epitelio intestinale, cute, epitelio alveolare). Maggiore è il coefficiente e minore è il raggio molecolare, più rapido è il passaggio attraverso tali barriere; è da tenere presente il fatto che il farmaco deve anche diffondere negli spazi intercellulari ricchi d'acqua, per cui deve possedere anche un certo grado di idrofilia. Farmaci molto idrofili, il cui passaggio attraverso le membrane cellulari è fortemente limitato, dovranno essere introdotti nel corpo mediante iniezione.

Dissolubilità del farmaco

Come si vedrà più in dettaglio a proposito dell'assorbimento per via orale, il grado di dissolubilità del farmaco è fondamentale per un suo assorbimento efficace. Per dissolubilità si intende la capacità della preparazione farmaceutica di sciogliersi completamente nell'ambiente da cui deve essere assorbita. Questo problema è importante per quei farmaci che vengono somministrati in forma solida o in sospensione: se la velocità di dissoluzione è più lenta di quella di assorbimento, il passaggio in circolo di questi farmaci è regolato dalla velocità con cui la preparazione si dissolve. In alcuni casi il farmaco viene appositamente preparato in modo che la sua dissoluzione sia particolarmente lenta così da assicurare un assorbimento lento e prolungato (preparazioni ritardo).

La velocità di dissoluzione di una preparazione farmaceutica è direttamente dipendente dalla sua superficie, dalla sua solubilità e dalla temperatura; essa può essere influenzata dal pH, ma un ruolo importante è ovviamente giocato dalla composizione dell'eccepiante e dalla presenza di eventuali rivestimenti protettivi (ad esempio, capsule insolubili in ambiente acido per evitare la distruzione del farmaco durante il passaggio nel lume gastrico). È importante quindi notare che diverse preparazioni farmaceutiche dello stesso principio attivo possono venire assorbite in misura o con velocità assai differenti (Figura 50.1).

Negli ultimi vent'anni una intensa attività di ricerca e sviluppo ha riguardato lo studio e la sintesi di sempre nuovi polimeri in grado di legare farmaci con maggiore o minore avidità e di rilasciarli in modo complesso e selettivo, in modo da ottenere concentrazioni terapeutiche nel momento e/o nel sito cellulare opportuni. Questi approcci verranno discussi alla fine del capitolo (drug delivery).

Estensione della superficie assorbente

È intuitivo che maggiore è la superficie assorbente più rapido è l'assorbimento di un farmaco. L'enorme estensione della superficie dell'intestino rispetto a quella gastrica fa sì che in genere i farmaci somministrati per os siano assorbiti prevalentemente a livello del piccolo intestino. Lo stesso principio comporta che i gas anestetici somministrati per via inalatoria siano assorbiti nella loro quasi totalità a livello alveolare.

Permeabilità della superficie assorbente

A livello degli epitelii di rivestimento, la permeabilità della superficie assorbente è fondamentalmente dipendente dallo spessore e dall'eventuale corneificazione. Il passaggio di un farmaco attraverso l'epitelio intestinale (monostратificato) è più rapido rispetto a quanto avviene a livello faringeo (epitelio stratificato non corneificato) o a livello cutaneo (epitelio stratificato corneificato). Epitelii monostратificati differiscono tra loro in termini di permeabilità a farmaci idrofili, probabilmente in funzione della diversa estensione delle giunzioni occludenti nei vari organi. Situazioni patologiche possono modificare la permeabilità di un epitelio: farmaci applicati su abrasioni

TABELLA 50.2 Variabili che influenzano la velocità di assorbimento dei farmaci

Variabili dipendenti dal farmaco o dalla preparazione farmaceutica	Coefficiente di ripartizione
	Dissolubilità
Variabili dipendenti dalla superficie assorbente	Estensione
	Permeabilità

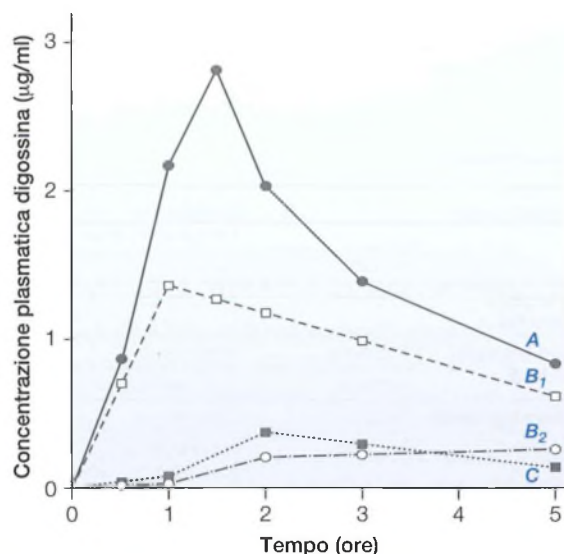


FIGURA 50.1 Variabilità farmacocinetica. Il grafico mostra l'andamento della concentrazione plasmatica di digossina a seguito di somministrazione allo stesso soggetto di quattro formulazioni commerciali di digossina prodotte da tre aziende diverse (indicate con A, B e C). Ogni somministrazione era distanziata di una settimana. In tutti i casi il soggetto riceveva due compresse di digossina da 0,25 mg accompagnate da 100 ml di acqua, al mattino a digiuno. Si può notare l'estrema variabilità della biodisponibilità sebbene si tratti della stessa molecola, prodotta addirittura dalla stessa azienda nel caso di B₁ e B₂. La diversa biodisponibilità provoca picchi plasmatici diversi in termini sia quantitativi che temporali.

o ulcere cutanee possono ad esempio passare rapidamente in circolo.

Per farmaci somministrati per iniezione, non direttamente nel torrente ematico, il passaggio in circolo richiede il superamento della barriera endoteliale capillare che, come visto nel Capitolo 49, è permeabile anche a sostanze idrofile di dimensioni relativamente grandi. La velocità dell'assorbimento dipende perciò quasi esclusivamente dal grado di perfusione ematica al sito di inoculazione (vedi oltre); in piccola parte essa può essere influenzata anche dallo stato di idratazione del tessuto connettivale circostante (variabile tra tessuti e con l'età).

Vascularizzazione

Maggiori sono la vascularizzazione e il flusso ematico della zona di somministrazione, maggiore è la velocità di assorbimento. Un farmaco iniettato per via intramuscolare raggiunge il circolo più rapidamente rispetto a quanto impiegherebbe se iniettato per via sottocutanea in quanto il tessuto muscolare è più riccamente vascularizzato. Stati infiammatori locali o aumenti del flusso ematico dovuti a richieste funzionali (attività fisica nel muscolo, esposizione della cute a fonti di calore) possono modificare profondamente la velocità di assorbimento di un farmaco. Sostanze vasoconstrictrici sono spesso iniettate insieme agli anestetici locali per ridurre la velocità di assorbimento e consentire una maggiore persistenza in loco e durata dell'anestesia locale.

Vie enterali

La somministrazione "enterale" (in senso lato) di farmaci può essere fatta per via orale, buccale (o sublinguale) e rettale. Attraverso queste vie, i farmaci possono essere somministrati in modo sicuro, semplice, senza provocare dolore e senza la necessità di intervento di personale specializzato. L'assorbimento avviene secondo i principi e i meccanismi già enunciati a proposito del passaggio di farmaci attraverso membrane cellulari (vedi Capitolo 49); tuttavia, all'interno dell'apparato gastroenterico, il farmaco è esposto a condizioni chimico-fisiche variabili che possono sia influenzare l'entità e la velocità di assorbimento che alterare le caratteristiche chimiche e quindi l'efficacia del farmaco stesso. Di conseguenza, non tutti i farmaci possono essere somministrati per questa via. Farmaci che sono poco o nulla assorbiti a livello gastrointestinale possono essere molto utili per il trattamento topico di alcune affezioni intestinali (in particolare infezioni o alterazioni della flora endogena).

In senso stretto, tra queste vie solo quella orale è propriamente "enterale", in quanto il farmaco deve raggiungere l'intestino tenue ed essere condotto in circolo attraverso la vena porta e il circolo portale epatico; attraverso la via buccale/sublinguale e quella rettale l'accesso è diretto al circolo venoso sistemico, attraverso rispettivamente le vene cave superiore e inferiore.

Via orale

La biodisponibilità orale

Il meccanismo principale che controlla il passaggio dei farmaci dal lume gastrointestinale al sangue è la diffusione passiva; quindi l'assorbimento per questa via è influenzato dal coefficiente di ripartizione del farmaco e dal suo eventuale grado di ionizzazione. La porzione del tratto digerente dotata di maggiore superficie e più riccamente vascularizzata è il piccolo intestino che rappresenta la sede ove maggiore è l'assorbimento di molti dei farmaci somministrati per via orale.

Per giungere nella circolazione sistemica, un farmaco somministrato per via orale deve dissolversi nel lume del tubo digerente, attraversare la mucosa gastrointestinale e, dopo essere stato immesso nel sistema portale, superare il fegato. Ciascuna di queste tappe può limitare la quota di farmaco in grado di distribuirsi nel corpo del paziente: questo concetto viene espresso con il termine di *biodisponibilità orale* che definisce la percentuale della dose somministrata che effettivamente entra nella circolazione sistemica ed è in grado di distribuirsi a tutto l'organismo. La biodisponibilità orale e la velocità dell'assorbimento possono mutare in relazione allo stato funzionale dell'apparato digerente, allo stato fisico e alla composizione del contenuto, alla velocità di transito attraverso stomaco e piccolo intestino, all'attività della flora intestinale e all'eventuale metabolizzazione del farmaco da parte del fegato. In taluni casi, ciò può rendere difficoltoso stimare con accuratezza i livelli plasmatici ottenibili dopo somministrazione orale. La conoscenza dei processi biologici,

fisiologici e farmacocinetici che sottendono a questa variabilità è quindi fondamentale per un intelligente uso dei farmaci somministrati per via orale.

L'assorbimento avviene soprattutto a livello del piccolo intestino

La porzione del tubo gastroenterico in cui avviene la maggior parte dell'assorbimento dei farmaci è il piccolo intestino; ciò è dovuto al fatto che in questa sede l'estensione della superficie assorbente è enorme (circa 200 m²) e il flusso ematico è relativamente alto (circa 1 l/min; i corrispondenti valori per lo stomaco sono di 1 m² e 0,15 l/min). Inoltre la mucosa del piccolo intestino è permeabile a molte sostanze di piccole dimensioni anche se dotate di un coefficiente di ripartizione relativamente basso: per molti farmaci quindi la velocità dell'assorbimento è dipendente soprattutto dal flusso ematico dell'intestino. Le grosse differenze di superficie assorbente, vascolarizzazione e permeabilità tra intestino e stomaco spiegano come mai l'assorbimento di un acido debole come l'aspirina sia molto più efficiente a livello intestinale che gastrico sebbene nell'intestino, dato il pH quasi neutro, prevalga la forma dissociata del farmaco.

Per le sostanze chimiche di grosse dimensioni o dotate di un notevole grado di idrofilia, la velocità dell'assorbimento è più lenta e relativamente indipendente dal flusso ematico. Soprattutto per queste sostanze le variazioni (funzionali, patologiche o iatrogene) della velocità del transito lungo il tubo digerente possono portare a importanti modificazioni della biodisponibilità orale. È da ricordare che il tempo di transito nell'intero apparato digerente è di 1-2 giorni, ma il transito nella stazione principale di assorbimento – il piccolo intestino – è normalmente di circa 3 ore ed è indipendente dalla presenza di contenuto nel lume. Alterazioni della peristalsi intestinale possono ridurre o prolungare enormemente il tempo a disposizione per l'assorbimento del farmaco e possono quindi alterare l'entità della quota assorbita; ciò è particolarmente importante per quei farmaci che sono assorbiti lentamente (o in modo incompleto).

L'effetto finale che modificazioni del tempo di transito nell'intestino hanno sull'assorbimento dei farmaci non è sempre prevedibile: è buona regola perciò evitare di somministrare farmaci che possano alterare la motilità gastrointestinale quando è in corso una terapia multifarmacologica somministrata per os. Un elenco parziale di farmaci la cui somministrazione può influenzare l'assorbimento per via orale di altri farmaci, è mostrato nella tabella 50.3.

L'assorbimento può essere influenzato dalla velocità di svuotamento dello stomaco

Nello stomaco l'assorbimento è generalmente scarso perché la mucosa gastrica, a differenza di quella intestinale, è poco estesa ed è scarsamente permeabile a molecole poco lipofile, anche se di piccole dimensioni. Dal punto di vista della farmacocinetica, lo stomaco deve essere quindi considerato non tanto come superficie assorbente quanto come organo di deposito che rilascia il farmaco assunto per os all'organo assorbente, cioè il piccolo

TABELLA 50.3 Alterazioni dell'assorbimento per via orale indotte da concomitante somministrazione di altri farmaci

Farmaci che alterano l'assorbimento	Effetto sull'assorbimento	Farmaci il cui assorbimento è alterato
Farmaci anticolinergici	Riduzione	Paracetamolo, tetracicline, fenilbutazone, litio (preparazioni ritardo)
	Aumento	Digossina
Analgesici narcotici	Riduzione	Alcol, morfina
Antidepressivi triciclici	Riduzione	Fenilbutazone
	Aumento	Acido para-amminosalicilico
Metoclopramide	Riduzione	Digossina
	Aumento	Aspirina, levodopa, paracetamolo, tetracicline, litio (preparazioni ritardo)

intestino. È quindi importante ricordare quali sono i fattori che controllano la velocità dello svuotamento dello stomaco perché essi avranno un ruolo importante nel determinare la velocità dell'assorbimento e quindi la rapidità dell'insorgenza dell'effetto del farmaco e il suo livello plasmatico massimo.

A digiuno, lo svuotamento gastrico di liquidi, inclusi i farmaci in essi disciolti, è relativamente rapido. In questa fase lo stomaco presenta periodi di contrazione e rilassamento di durata variabile che culminano in un'intensa contrazione espulsiva che avviene ciclicamente ogni 30 minuti circa. Il tempo necessario perché il farmaco venga espulso dallo stomaco dipende dall'intervallo intercorrente tra la somministrazione e la successiva onda espulsiva. Per farmaci somministrati in forma solida, il tempo può essere anche più lungo se la dissoluzione nei succhi gastrici non è completa in quanto frammenti della preparazione farmaceutica possono restare adesi alle pareti gastriche e non venire espulsi.

Molto più complessa è la situazione quando il farmaco viene assunto a stomaco pieno. Le onde cicliche espulsive presenti a digiuno sono ora rimpiazzate da contrazioni regolari e discrete che provvedono a mescolare e tritare il contenuto gastrico; attraverso il piloro passano solo particelle di dimensioni inferiori ai 2 mm. Il tempo di svuotamento dello stomaco è in questo caso molto allungato (circa 7 ore per pasti normali, ancor più per pasti ricchi di grassi, molto meno per colazioni leggere) e di conseguenza il passaggio dei farmaci nel piccolo intestino è ritardato. Per farmaci somministrati in forma solida si aggiunge un'ulteriore complicazione legata al fatto che la preparazione farmaceutica deve dissolversi in particelle di diametro inferiore ai 2 mm perché possa passare nel piccolo intestino. È quindi chiaro che se si vuole ottenere un rapido assorbimento di un farmaco sarà necessario somministrarlo a digiuno e, possibilmente, in forma liquida.

L'aumento del pH può accelerare lo svuotamento gastrico a digiuno; questo probabilmente spiega perché le forme tamponate di acido acetilsalicilico siano assorbite più rapidamente di quelle non tamponate. Modificazioni del pH gastrico si possono avere, oltre che durante i processi

digestivi, anche a seguito di trattamenti farmacologici che inibiscono la secrezione gastrica o che tamponano l'acido presente nel lume (antiacidi). È da notare che la composizione chimica degli stessi antiacidi può modificare la velocità dello svuotamento gastrico: ad esempio, sali trivalenti di alluminio rallentano lo svuotamento gastrico mentre gli ioni magnesio l'accelerano.

La contemporanea assunzione di cibo può modificare l'assorbimento di numerosi farmaci

Al di là degli effetti sullo svuotamento gastrico, che si riflettono in alterazione del tempo necessario per raggiungere la sede di assorbimento principale (vedi sopra), la presenza di cibo nell'intestino può modificare sia la velocità dell'assorbimento intestinale dei farmaci che la loro biodisponibilità (Tabella 50.4). Come detto in precedenza, il fattore limitante l'assorbimento dei farmaci (ad esclusione di quelli molto idrofili e di grosse dimensioni) è il flusso ematico intestinale. Questo, ovviamente, varia notevolmente a seconda della presenza e del tipo di cibo nel lume intestinale: liquidi ricchi di proteine aumentano il flusso ematico nel territorio splancnico, mentre liquidi ricchi in carboidrati lo diminuiscono. È da ricordare che variazioni del flusso ematico del piccolo intestino possono essere dovute anche a processi patologici.

La biodisponibilità orale può essere influenzata dalla contemporanea assunzione di cibo se il farmaco, estratto dal sangue portale a livello epatico mediante sistemi di trasporto saturabili, è rapidamente inattivato dagli epatociti (effetto di primo passaggio, vedi oltre). È questo il caso del propranololo (un antagonista β -adrenergico) i cui livelli massimi sono più alti se viene somministrato durante i pasti: benché la velocità di assorbimento sia poco modificata dalla contemporanea assunzione di cibo, la concentrazione plasmatica di propranololo è più alta in

quanto i meccanismi di cattura epatica sono saturati da altri substrati nel corso dei processi digestivi.

Modificazioni chimiche dei farmaci possono alterarne la biodisponibilità

La biodisponibilità dei farmaci somministrati per via orale può essere modificata da reazioni chimiche che possono aver luogo nel lume intestinale o a livello epatico. Nella tabella 50.5 sono elencati a titolo di esempio alcuni degli eventi fisico-chimici che possono avvenire all'interno del lume gastrointestinale e che possono alterare l'assorbimento o l'attività di alcuni farmaci. In alcuni casi si tratta di formazione di complessi insolubili con costituenti alimentari o altri farmaci presenti nel lume intestinale: è il caso delle tetracicline che formano complessi insolubili e quindi non assorbibili con cationi polivalenti presenti in gran quantità nel latte o in alcuni antiacidi.

Le reazioni chimiche possono essere enzimatiche e non-enzimatiche, dovute all'acido cloridrico prodotto dallo stomaco o catalizzate da enzimi digestivi o prodotti dalla flora batterica che normalmente risiede nel grosso intestino. L'effetto sui farmaci è in genere di riduzione della loro attività.

I farmaci assorbiti a livello intestinale passano attraverso il fegato, l'organo principale di metabolizzazione, prima di poter giungere alla circolazione sistemica. Nella tabella 50.6 vengono elencati alcuni farmaci la cui metabolizzazione epatica porta a riduzione o a perdita dell'attività farmacologica; la loro cattura durante il loro primo passaggio attraverso il fegato è così significativa da ridurre consistentemente la quota biodisponibile (in grado di raggiungere la circolazione sistemica). Si parla in questo caso di *effetto di primo passaggio*.

Per alcuni farmaci, l'effetto di primo passaggio può essere così intenso da abolire quasi completamente l'efficacia della dose somministrata per via orale. È questo il caso di farmaci come l'isoproterenolo (un agonista adrenergico) e la trinitrina (un farmaco antianginoso). In questi casi l'unica alternativa è cambiare la via di somministrazione o utilizzare un composto diverso. Nel caso della trinitrina, l'approccio più usato è quello di somministrare il composto per via buccale (sottolinguale): in questo caso non vi è effetto di primo passaggio in quanto il sangue venoso refluo dalla cavità buccale giunge alla circolazione sistemica attraverso la vena cava superiore, senza passare attraverso il fegato.

TABELLA 50.4 Effetto della contemporanea assunzione di cibo sull'assorbimento di alcuni farmaci somministrati per via orale

Assorbimento ridotto	Assorbimento aumentato
Ampicillina	Griseofulvina
Amoxicillina	Carbamazepina
Rifampicina	Propranololo
Aspirina	Metoprololo
Isoniazide	Spironolattone
Levodopa	Idralazina

TABELLA 50.5 Reazioni che possono avvenire nel lume gastrointestinale e modificare la biodisponibilità orale di farmaci

Reazione	Farmaco	Effetto
Formazione di complessi	Tetracicline	Complessi insolubili con ioni polivalenti come Ca^{2+} e Al^{3+}
Coniugazione	Solfoconiugazione	Isoproterenolo
	Glicuronazione	Salicilamide
Decarbossilazione	Levodopa	Perdita di attività farmacologica
Idrolisi	Acida	Penicillina G
		Eritromicina
	Enzimatica	Aspirina
Riduzione (flora intestinale)	Sulfasalazina	Formazione di acido 5-amminosalicilico attivo

TABELLA 50.6 Esempi di farmaci sensibili all'effetto di primo passaggio se somministrati per via orale

Amitriptilina	Antidepressivo triciclico
Desipramina	Antidepressivo triciclico
Diltiazem	Calcio-antagonista
5-Fluorouracile	Chemioterapico
Isoproterenolo	Agonista β -adrenergico
Labetalolo	Antagonista adrenergico
Lidocaina	Anestetico locale, antiaritmico
Mercaptopurina	Chemioterapico
Metoprololo	Antagonista β -adrenergico
Morfina	Analgesico oppiaceo
Neostigmina	Inibitore colinesterasi
Nifedipina	Calcio-antagonista
Nitroglicerina	Antianginoso
Propranolo	Antagonista β -adrenergico
Testosterone	Ormone sessuale
Verapamil	Calcio-antagonista

Vie buccale e rettale

Queste vie di somministrazione sono utilizzate soprattutto per quei farmaci in cui la scarsa biodisponibilità per via orale è dovuta a inattivazione intraluminale o a effetto di primo passaggio; infatti il sangue refluo dal cavo buccale e dai plessi emorroidali inferiore e (in parte) medio giunge al ventricolo destro senza passare attraverso il fegato.

Come accennato in precedenza, la via buccale (sottolinguale) è la via d'elezione per la somministrazione della trinitrina; dato l'alto grado di vascolarizzazione della lingua e l'alto coefficiente di ripartizione della trinitrina, questa via di somministrazione consente di ottenere concentrazioni plasmatiche efficaci del farmaco nel giro di pochi minuti.

La via rettale è particolarmente utile per somministrare farmaci in pazienti incapaci di deglutire o in preda a vomito. Poiché l'assorbimento rettale è in genere più lento e prolungato, questa via è spesso usata per il mantenimento di concentrazioni efficaci di alcuni farmaci antinfiammatori o broncodilatatori durante le ore notturne. Occorre però considerare che la biodisponibilità per via rettale è in genere di gran lunga più imprevedibile rispetto ad altre vie di somministrazione.

Vie parenterali sistemiche

Via intravascolare

La via intravascolare è da preferirsi in tutte quelle condizioni in cui si richiede rapidità d'intervento e/o controllo rapido dell'efficacia dell'intervento terapeutico. Il grosso vantaggio di questa via di somministrazione è che il farmaco viene immesso totalmente e direttamente nel circolo ematico e quindi la sua disponibilità a presentarsi sul suo sito d'azione è esclusivamente legata alla capacità di uscire dal letto capillare.

L'iniezione viene generalmente fatta a livello venoso men-

tre l'uso della via arteriosa è limitato a quelle situazioni in cui si richiede che il farmaco si presenti in alte concentrazioni in un organo specifico come nel caso di alcuni chemioterapici o in corso di angiografia. La somministrazione può avvenire sia in forma di un unico bolo che per infusione continua a velocità controllata (comunemente detta fleboclisi).

La via endovenosa (ev) è utilizzata anche per quelle sostanze che non sono assorbite in modo adeguato o prevedibile attraverso altre vie; questo è soprattutto il caso di farmaci ad alto peso molecolare (ad esempio, gli emoderivati) che avrebbero difficoltà a penetrare nel torrente circolatorio dal sito di inoculazione, o di farmaci dotati di scarsa o variabile biodisponibilità orale. Infine, si utilizza la via endovenosa per farmaci o preparazioni farmaceutiche irritanti, la cui somministrazione per via intramuscolare o sottocutanea sarebbe particolarmente dolorosa.

Alcune considerazioni per ridurre i rischi legati alla somministrazione per via intravascolare

La via endovenosa comporta alcuni rischi che possono essere ridotti attuando alcuni accorgimenti propri della buona pratica medica (Tabella 50.7). Il primo rischio da tenere in considerazione è il fatto che, una volta immesso nel torrente circolatorio, il farmaco non è più recuperabile; questo non è il caso della somministrazione per via orale, dove l'eccesso di farmaco (assunto ad esempio a scopo suicida) può essere sottratto al paziente inducendo vomito o facendo una lavanda gastrica o somministrando composti non assorbibili capaci di adsorbire il farmaco ancora presente nel lume. Il secondo rischio è legato a somministrazione troppo rapida del farmaco; in questo caso il danno che può subire il paziente riguarda soprattutto gli organi più perfusi come il cuore e il cervello.

L'esempio che segue può essere illuminante. Per ottenere un rapido effetto antiaritmico, si decide di iniettare endovena un bolo di 150 mg di lidocaina in un paziente di 75 kg; poiché il volume in cui questo farmaco si distribuisce è di circa 1 l/kg di peso corporeo, si otterrà una concentrazione plasmatica di 2 mg/l che è quella efficace per questo farmaco. Quando la concentrazione plasmatica supera i 10 mg/l insorgono gravi effetti collaterali soprattutto a carico del SNC. Supponiamo che la dose venga iniettata in un solo secondo: poiché la gittata cardiaca è di circa 0,1 l/sec, il sangue che uscirà dal cuore conterrà l'intero bolo in 0,1 l: la concentrazione della lidocaina sarà, per un periodo di tempo molto breve, di 1500 mg/l cioè 150 volte superiore a quella massima tollerata! Anche assumendo che il farmaco si distribuisca molto rapidamente nell'intero sistema circolatorio (circa 5 l) avremo comunque una concentrazione plasmatica di circa 30 mg/l e il cervello sarà senz'altro esposto per un certo tempo a dosi tossiche. È sempre raccomandabile somministrare la dose endovena molto lentamente, in un periodo di tempo che sia almeno pari al tempo di circolo (circa 2 min). Ciò consente tra l'altro di rilevare eventuali effetti tossici acuti nel paziente e di sospendere la somministrazione del farmaco prima di aver completamente svuotato la siringa.

TABELLA 50.7 Possibili complicanze associate a somministrazione endovenosa di farmaci

Effetti tossici improvvisi	Somministrazione troppo rapida
Infezioni	Materiale e/o composti non sterili
Embolismo	Infusione di sostanze oleose
	Infusione di volumi consistenti di aria o gas
	Utilizzo di soluzioni a osmolarità non corretta
	Presenza di precipitati nella soluzione

Embolismo e infezioni sono ulteriori complicazioni che possono essere indotte da somministrazione di farmaci attraverso la via endovenosa. L'embolismo può essere indotto da somministrazione di farmaci in sospensione oleosa e non destinati a somministrazione endovenosa o dalla presenza di eventuali precipitati nella soluzione. Aggregati di globuli rossi possono formarsi a seguito di somministrazione di soluzioni ipertoniche, mentre emolisi può essere indotta da rapida infusione di soluzioni ipotoniche. Le complicanze infettive erano comuni prima dell'introduzione di aghi e siringhe monouso ma, come ben noto, sono tuttora un problema tra la popolazione dei tossicodipendenti che si auto-somministrano psicofarmaci per via endovenosa.

Via intramuscolare

La somministrazione dei farmaci per via intramuscolare viene fatta iniettando una soluzione di farmaco nel tessuto muscolare. La scelta della sede dipende dalla quantità di liquido da iniettare (minima nel deltoide, maggiore nel quadricipite femorale o gluteo medio). La sede deltoidea è preferita per farmaci che possono generare reazioni di ipersensibilità (e vaccini) in quanto è possibile applicare un laccio alla spalla per ridurre la perfusione e l'assorbimento in caso di reazioni avverse. In generale, la sede più utilizzata è il muscolo gluteo che consente di iniettare volumi di soluzione anche superiori ai 5 ml; nei soggetti anziani e nei bambini occorre porre particolare attenzione nell'evitare lesioni al nervo sciatico. I farmaci sciolti in soluzione acquosa e iniettati per via intramuscolare sono in genere completamente assorbiti nel giro di 10-30 min; la velocità dell'assorbimento è strettamente dipendente dal grado di irrorazione del muscolo (variabile a seconda del muscolo e dell'attività fisica a cui è sottoposto), ma può essere influenzata anche dal coefficiente di ripartizione del farmaco, dal volume e dalla osmolarità della soluzione iniettata. Piccole molecole (come sono normalmente i farmaci) possono entrare direttamente nel torrente ematico, mentre grosse proteine vi arrivano solo dopo essere passate per il circolo linfatico. Farmaci che sono insolubili al pH interstiziale o che sono sospesi in soluzioni oleose vengono assorbiti più lentamente; ciò può essere di ovvio vantaggio e viene sfruttato nelle cosiddette preparazioni ritardo (o deposito) in cui il principio attivo è presente in forma insolubile; ad esempio, il sale di procaina della penicillina G è completamente assorbito in 24 ore, mentre per il sale sodico bastano 2-3 ore.

L'iniezione intramuscolare può comportare alcune complicazioni quali dolore (dovuto alla distensione e all'irritazione del tessuto muscolare), lesioni vascolari o nervose (dovute a imperizia), e ascessi o necrosi (dovuti a iniezione di sostanze irritanti o a insufficiente controllo delle condizioni di asepsi). L'osservanza delle comuni regole della buona pratica medica può ridurre al minimo queste complicazioni.

Via cutanea

La somministrazione di farmaci per via cutanea può essere effettuata mediante iniezione sottocutanea o intradermica. La via intradermica prevede che un piccolo volume di liquido (0,1-0,2 ml) sia iniettato nel tessuto connettivo dermico sottostante l'epidermide; essa è quasi esclusivamente utilizzata per l'introduzione di allergeni a scopo diagnostico.

Più comune è l'uso della via sottocutanea in cui il farmaco viene iniettato nel tessuto connettivale sottocutaneo che è in grado di accogliere volumi più consistenti (in genere non più di 2 ml). Le sedi più utilizzate sono la faccia ventrale dell'avambraccio e le porzioni laterali della superficie addominale. Flusso ematico ed estensione della superficie assorbente controllano la velocità di assorbimento dei farmaci attraverso questa via. Il flusso ematico è inferiore a quello muscolare per cui l'assorbimento dei farmaci avviene in genere più lentamente. Ovviamente, si deve evitare di somministrare tutte quelle preparazioni che possano essere irritanti.

La velocità di assorbimento per questa via è estremamente variabile anche per uno stesso individuo ed è influenzata dal flusso ematico locale; ad esempio, l'aggiunta di minime quantità di adrenalina, producendo vasocostrizione, rallenta l'assorbimento sistemico e consente una maggiore e più prolungata efficacia dei farmaci anestetici locali iniettati per inibire la conduzione nelle fibre sensitive presenti nell'area sottocutanea circostante. Pertanto, la via sottocutanea può essere impiegata anche per applicazioni *topiche*; si tenga però presente che un certo grado di assorbimento sistemico è sempre presente. Le caratteristiche fisiche della cute rendono il tessuto sottocutaneo la sede ideale per l'impianto di forme a lungo deposito di farmaci; in genere il farmaco deve essere relativamente insolubile e sciolto in un eccipiente semisolido che non dissolva rapidamente una volta a contatto con il tessuto sottocutaneo. Questa modalità di somministrazione ha trovato un qualche successo nelle terapie a base di ormoni steroidei. È interessante il fatto che la velocità di assorbimento dipende dalla superficie della sfera, disco o cilindro in cui il farmaco è dissolto; variando forma e volume, si può quindi modificare in modo prevedibile la velocità di assorbimento. L'insulina-zinco è una preparazione di microcristalli di dimensioni omogenee che si dissolvono a livello sottocutaneo con velocità costante e relativamente bassa; ciò consente di mantenere costante per diverse ore la concentrazione plasmatica dell'ormone.

Complicazioni che possono essere associate alla sommi-

nistrazione per via sottocutanea sono dolore, ascesso o necrosi dovute a somministrazione di farmaci irritanti o a scarso controllo delle condizioni di asepsi.

Altre vie

Via inalatoria

L'assorbimento di farmaci a livello alveolare è in genere molto rapido data la grande estensione della superficie assorbente (circa 100 m²) e la stretta vicinanza tra epitelio alveolare ed endotelio capillare. I farmaci vengono somministrati sotto forma di gas o di aerosol; essi possono essere destinati sia a un uso topico, come nel trattamento delle ostruzioni bronchiali, sia a uso sistemico, come nel caso dei gas anestetici generali. Questi ultimi hanno in genere un coefficiente di ripartizione molto alto per cui diffondono rapidamente attraverso le cellule della parete alveolare e dei capillari alveolari. La rapidità e la durata dell'effetto dipendono soprattutto dal coefficiente di ripartizione sangue/aria; le problematiche farmacocinetiche relative ai gas anestetici sono discusse in dettaglio nel Capitolo 53. Alcuni farmaci vengono somministrati per via inalatoria con lo scopo di ottenere forti concentrazioni locali (uso topico) senza provocare importanti effetti sistemici. La rapidità e l'abbondanza dell'assorbimento possono però determinare il passaggio di una quota cospicua del farmaco somministrato nel torrente circolatorio. Vengono in genere somministrati direttamente a livello delle vie respiratorie farmaci utilizzati nel trattamento delle patologie bronchiali o polmonari come broncodilatatori, cortisonici, antiallergici, mucolitici e antibiotici.

La deposizione delle particelle di aerosol nei vari tratti dell'albero respiratorio dipende dalle loro dimensioni

Farmaci in forma solida o liquida non volatile possono essere sospesi in aria o in altri gas e somministrati nell'apparato respiratorio in forma di aerosol, cioè di particelle di dimensioni così ridotte da rimanere a lungo sospese e sedimentare lentamente. La maggior parte delle particelle di aerosol si deposita sulle pareti dell'albero respiratorio per impatto. La percentuale di particelle che "impatta" dipende dalla velocità di sedimentazione, dalla velocità di diffusione e dalla precipitazione inerziale (quest'ultima indica la tendenza di una particella a proseguire lungo la stessa direzione quando il flusso d'aria cambia direzione, come succede a livello delle biforcazioni bronchiali).

Se si consulta la tabella 50.8, si può notare come la percentuale di deposizione lungo i vari tratti dell'albero respiratorio dipenda sia dal diametro delle particelle che dal volume inspiratorio. Poiché la velocità di sedimentazione delle particelle è proporzionale al loro diametro, la percentuale totale di particelle (e quindi di farmaco inalato) che è trattenuta lungo le vie respiratorie diminuisce col diminuire del diametro. Allo stesso tempo le particelle più grosse tendono a depositarsi nelle vie aeree superiori, mentre quelle più piccole tendono a depositarsi nelle ramificazioni bronchiali più sottili. Particelle di diametro

superiore ai 20 µm sono utili come carrier di farmaci diretti contro patologie delle vie respiratorie superiori, mentre saranno del tutto inutili per patologie bronchiolari e alveolari. Particelle con diametro compreso tra 10 e 1 µm sono ideali per il trattamento delle affezioni bronchiolari e alveolari; particelle di diametro inferiore vengono in buona parte esalate senza essere trattenute.

La probabilità che una particella si depositi aumenta a mano a mano che si riduce la velocità del flusso, per cui la deposizione di particelle di diametro medio-piccolo è generalmente abbondante a livello dei bronchioli terminali e degli alveoli dove la velocità è minima; per lo stesso motivo la percentuale di particelle che si deposita nei vari tratti dell'albero respiratorio dipende anche dal volume inspiratorio, il cui aumento comporta velocità di transito maggiori. In sintesi, quanto più piccolo è il diametro delle particelle e quanto minore il volume respiratorio, tanto più profondamente nelle vie bronchiali tendono a depositarsi le particelle.

Fattori che influenzano le percentuali di deposizione dell'aerosol lungo le vie respiratorie sono, oltre alle dimensioni delle particelle e al volume inspiratorio, lo stato di pervietà delle vie respiratorie (la penetrazione di un aerosol nelle vie respiratorie è molto ridotta in pazienti con malattie polmonari ostruttive croniche), il momento del ciclo respiratorio in cui l'aerosol è somministrato, la stabilità e la tensione superficiale dell'aerosol e le caratteristiche tecniche del sistema di generazione dell'aerosol. In considerazione di tutto ciò, è chiaro che l'assorbimento dei farmaci attraverso la via inalatoria è estremamente variabile.

Spesso i farmaci vengono somministrati in forma di aerosol ottenuto da una bomboletta spray contenente un propellente inerte sotto pressione da cui, per ogni pressione della valvola, viene rilasciata una quantità controllata di miscela propellente-farmaco. Per quei pazienti in cui il coordinamento tra rilascio dello spray e inalazione è scarso, esistono apparecchi in cui il farmaco, presente in forma di fine polvere, viene sospeso nell'aria da un sistema di eliche mosse dall'inspirazione stessa del paziente. Molto comune è l'uso dei nebulizzatori, in cui un getto d'aria è utilizzato per nebulizzare una soluzione liquida contenente il farmaco; in questo modo vengono

TABELLA 50.8 Percentuali di ritenzione di particelle di aerosol in varie regioni dell'apparato respiratorio

Volume inspiratorio Livello	450 cm ³ diametro particelle				1500 cm ³ diametro particelle			
	20	6	2	0,2	20	6	2	0,2
Vie respiratorie superiori	33	0	0	0	47	5	0	0
Grossi rami bronchiali	54	22	5	1	51	47	11	1
Bronchioli terminali e respiratori	6	30	11	7	1	12	5	4
Alveoli	0	30	25	8	0	16	28	12
Totale depositato	93	82	41	16	99	80	44	17

generalmente ottenute particelle di medio-grosso calibro e questo strumento dovrebbe essere utilizzato solo per somministrare farmaci destinati alla cura di patologie delle vie aeree superiori o dei grossi bronchi.

Applicazioni topico-regionali

Antinfiammatori, anestetici locali e antibiotici possono essere iniettati all'interno delle capsule articolari (via intrarticolare) per la cura di patologie articolari. Somministrazioni ripetute e frequenti possono avere effetti lesivi. L'iniezione intratecale (via intratecale) viene utilizzata quando si vogliono ottenere effetti rapidi a livello delle meningi e delle radici dei nervi spinali; in questo modo viene superato l'ostacolo della barriera ematoencefalica. I farmaci vengono introdotti nello spazio subaracnoideo spinale per iniezione lombare o nelle cavità ventricolari; in genere, prima di introdurre il farmaco, si aspira un pari volume di liquido cefalorachidiano. Questa via è utilizzata per trattare infezioni acute o tumori cerebrali o spinali e per introdurre mezzi di contrasto per indagini radiografiche; per facilitare la diffusione del farmaco verso tratti più alti del SNC, il farmaco può essere dissolto in una soluzione meno densa del liquor mentre il paziente viene mantenuto in stazione eretta. Attraverso la via intratecale, possono essere somministrati anche farmaci anestetici con lo scopo di produrre anestesia spinale (il farmaco è iniettato nello spazio subaracnoideo); più comunemente, però, si preferisce iniettare l'anestetico in sede epidurale. In tal caso, l'anestesia si instaura più lentamente in quanto il farmaco deve diffondere anche attraverso la dura madre; i vantaggi di questo approccio sono che l'anestetico diffonde meno agli altri livelli spinali, dà meno problemi di blocco ortosimpatico con le relative conseguenze cardiocircolatorie e blocca più efficacemente le radici dorsali a livello dei forami intervertebrali contribuendo all'anestesia anche a questo livello.

Vie intracavitare

Questo termine intende che il farmaco viene iniettato direttamente nella cavità peritoneale (via peritoneale, per lo più per uso sistemico) o pleurica (via pleurica, per lo più per uso topico). Entrambe le cavità posseggono un'ampia superficie riccamente vascolarizzata da cui il farmaco può essere rapidamente assorbito. I pericoli di lesioni agli organi interni limitano l'uso pratico di queste vie.

Via dermica o transcutanea

Nei distretti di facile accesso come la pelle, gli occhi e gli orifici e cavità degli apparati respiratorio, digerente e urogenitale è possibile la somministrazione diretta del farmaco dall'esterno; nella maggior parte dei casi lo scopo è quello di ottenere azioni locali o topiche. I farmaci sono applicati sui punti di interesse e non è intenzione che essi siano assorbiti e che abbiano effetti sistemici; ciò può tuttavia avvenire ed è importante che siano tenute in conto le condizioni che possono produrre assorbimenti abnormi.

Farmaci utilizzati per terapia topica a livello cutaneo sono presentati in forma di oli, creme, unguenti, paste, polveri dispersive, lozioni, spray e linimenti. Benché lo scopo dell'applicazione cutanea sia quello di consentire elevate concentrazioni del farmaco a livello locale, una quota variabile può essere assorbita e produrre effetti sistemici. La problematica relativa all'assorbimento di farmaci attraverso la cute è molto diversa rispetto al tratto gastroenterico. A livello cutaneo esistono infatti tre diversi potenziali siti d'accesso con caratteristiche di permeabilità molto diverse. Essi sono lo strato corneo, le ghiandole sudoripare (<0,1% della superficie corporea) e i follicoli piliferi (circa lo 0,2% della superficie corporea). In termini temporali, la prima via d'accesso è attraverso i follicoli piliferi; per alcuni farmaci, come gli steroidi, questa può rappresentare anche la via maggioritaria. Per altri, lo strato corneo può addirittura rappresentare un organo di deposito da cui il farmaco viene rilasciato lentamente e a lungo.

Età, sede di applicazione e presenza di patologie locali influenzano l'assorbimento per via cutanea

Diversi fattori influenzano l'assorbimento per via cutanea. Questi comprendono le condizioni della cute, il grado di vascolarizzazione e lo stato di idratazione, con marcate variazioni con l'età e differenze regionali; è inoltre rilevante il veicolo nel quale il farmaco è dissolto.

Abrasioni, lesioni ulcerative, ustioni e altre patologie possono portare a discontinuità dello strato corneo attraverso cui i farmaci possono rapidamente diffondere nel tessuto connettivale sottostante e da qui raggiungere la circolazione sistemica. È stato dimostrato che la penetrazione di idrocortisone aumentava considerevolmente (di più di 50 volte) dopo ripetuti *stripping* cutanei effettuati con cerotto dermico.

Il grado di vascolarizzazione della cute può influenzare l'entità dell'assorbimento: flogosi, aumento locale o generalizzato della temperatura corporea, combinazione con agenti irritanti o rubefacenti (in genere utilizzati per lenire il dolore o per aumentare la vascolarizzazione dei tessuti sottostanti) possono incrementare notevolmente l'assorbimento per via topica. Freddo, lacci emostatici e somministrazione contemporanea di vasocostrittori producono l'effetto opposto e possono essere utilizzati per ridurre l'assorbimento di sostanze tossiche.

L'età del soggetto può influenzare l'assorbimento in quanto la cute dell'infante ha uno strato corneo molto più sottile e idratato rispetto all'adulto. Per quel che riguarda neonati e infanti, è anche da tenere in considerazione che la dose somministrata ed eventualmente assorbita viene distribuita in un volume corporeo notevolmente inferiore rispetto all'adulto e può quindi generare concentrazioni plasmatiche elevate.

Regioni diverse della superficie corporea presentano cute di spessore e permeabilità diversi; in ordine di permeabilità crescente abbiamo le seguenti regioni: plantare, avambraccio, cuoio capelluto, scroto, faccia posteriore del padiglione auricolare.

Modificazioni dello stato di idratazione dello strato corneo possono modificare notevolmente il passaggio di

sostanze attraverso la cute. Nelle medicazioni occlusive, spesso usate in dermatologia, il grado di idratazione dello strato corneo può passare dal normale 10% a circa 50%; in queste condizioni la penetrazione di corticosteroidi attraverso la cute può aumentare di circa 100 volte e produrre effetti sistemici non indifferenti.

Il veicolo utilizzato nella preparazione farmaceutica e la sua eventuale evaporazione o assorbimento possono cambiare notevolmente la capacità di penetrazione del principio farmacologico. Ovviamente l'assorbimento dei farmaci dipende dal loro coefficiente di ripartizione: quando questi sono poco liposolubili, la loro sospensione in unguenti o creme grasse ne aumenta l'assorbimento. Sostanze come propilenglicole e dimetilsulfossido possono modificare l'assorbimento alterando lo stato di idratazione dello strato corneo (il dimetilsulfossido è un composto molto igroscopico).

Nonostante la bassa permeabilità della cute, la via cutanea è utilizzata per la somministrazione sistemica di alcuni farmaci, in particolare di quelli il cui assorbimento attraverso il sistema portale comporterebbe un'elevata distruzione. È il caso questo di unguenti contenenti gliceril-trinitrato, utilizzato per la terapia cronica dell'angina pectoris. Più frequente è l'uso di cerotti dermici contenenti farmaci anticinetopatici (mal di moto). Per assicurare un assorbimento omogeneo e costante, il cerotto va posto in una zona del corpo, come quella retroauricolare, in cui la cute è particolarmente sottile e poco esposta agli agenti atmosferici che indurrebbero variazioni della vascolarizzazione locale.

Vie mucosali

È possibile somministrare farmaci topicamente sulle mucose nasali, congiuntivali, orofaringee, vaginali e uretrali. Data la mancanza di strato corneo e la ridotta stratificazione epiteliale, l'assorbimento attraverso queste vie è in genere consistente e può dar luogo a effetti sistemici.

Per quel che riguarda la somministrazione a livello dell'occhio, l'assorbimento avviene in parte attraverso la congiuntiva e in parte attraverso la mucosa nasale a cui il farmaco giunge dopo essere stato drenato dal dotto lacrimale. Attraverso la cornea, i farmaci possono giungere all'umor acqueo e al vitreo e da qui raggiungere i vasi retinici: classico è l'uso di traccianti fluorescenti che, instillati a livello congiuntivale, consentono di visualizzare la rete vascolare della retina. È da tenere presente che il volume di liquido che può essere deposto su un occhio è di circa 20 microlitri: l'eventuale eccesso viene perso come lacrime o è drenato dal dotto congiuntivale. La via nasale è comunemente utilizzata con scopi topici per somministrare farmaci o sostanze vasoconstrictrici nel corso di congestioni nasali. Va tenuto presente che questo impiego, se prolungato, può portare ad alterazioni patologiche della mucosa che possono anche sfociare in vere e proprie ulcerazioni: è questo il caso della cocaina che, agendo da simpaticomimetico indiretto, può produrre nel tossicodipendente la necrosi del setto nasale. La via nasale viene utilizzata anche per la somministrazione, in

forma di spray, di peptidi e ormoni (ad esempio, calcitonina): l'assorbimento per questa via avviene sia grazie allo spessore particolarmente sottile della mucosa nasale che alla particolare configurazione delle cavità nasali che consente una lunga persistenza del farmaco nella sede di somministrazione.

Cinetiche di assorbimento

A parte la via intravascolare, con tutte le altre modalità di somministrazione il farmaco deve diffondere dal compartimento di somministrazione al sangue. Ciò avviene con una velocità che dipende dalle variabili elencate dalla tabella 50.2. In questo paragrafo si esaminerà come la scelta di una via di somministrazione influenzi sia la velocità dell'assorbimento che la quantità totale di farmaco assorbito e, di conseguenza, i livelli plasmatici ottenibili.

L'assorbimento della maggior parte dei farmaci segue una cinetica di I ordine

L'assorbimento dei farmaci somministrati per via orale o parenterale generalmente segue una cinetica di I ordine (flusso proporzionale alla concentrazione): la quantità di farmaco assorbita per unità di tempo è una percentuale costante di quella che rimane da assorbire; una cinetica di questo tipo è descritta da una curva in un grafico lineare e da una retta in un grafico semilogaritmico (Figura 50.2: linee continue). La cinetica è definita da una costante di assorbimento, k_a (frazione assorbita per unità di tempo), ovvero da una costante di tempo $\tau = 1/k_a$. Un utile parametro è l'emivita ($t_{1/2}$) ovvero il tempo necessario a dimezzare la concentrazione nel compartimento assorbente, che risulta essere un intervallo di tempo fisso, indipendentemente dalla concentrazione di partenza (Box 1). Le cinetiche di primo ordine indicano, in genere, che l'assorbimento avviene per lo più attraverso meccanismi diffusionali o trasporti non saturati. Nella

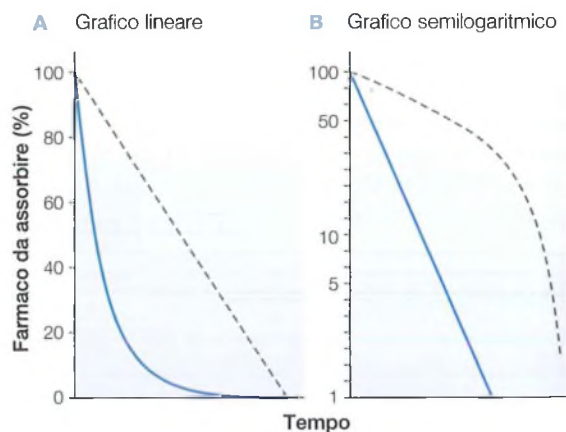


FIGURA 50.2 Rappresentazione lineare (A) e semilogaritmica (B) dell'andamento temporale della quantità di farmaco che resta da assorbire in un processo di assorbimento caratterizzato da una cinetica di I ordine (linee continue) o di ordine zero (linee tratteggiate).

maggior parte dei casi l'emivita di assorbimento varia tra 15 minuti e 1 ora.

Per alcuni farmaci, l'assorbimento avviene invece a velocità costante, e in questo caso si parla di cinetica di ordine zero (flusso indipendente dalla concentrazione). Le cinetiche di ordine zero sono descritte da una retta in un grafico lineare e da una curva in un grafico semilogaritmico (Figura 50.2: linee tratteggiate); una cinetica di ordine zero indica che il farmaco è assorbito attraverso meccanismi di trasporto attivi saturati (la velocità di trasporto in questo caso dipende essenzialmente dal numero di trasportatori in funzione). Nel seguito della trattazione si assumerà che l'assorbimento segua una cinetica di I ordine.

La velocità di assorbimento determina il livello del picco massimo plasmatico del farmaco e il tempo necessario per raggiungerlo

Quando un farmaco viene somministrato a un paziente, la sua concentrazione plasmatica sarà determinata dall'equilibrio tra assorbimento ed eliminazione. Inizialmente l'assorbimento è massimo e l'eliminazione è nulla. A mano a mano che il farmaco viene assorbito, l'assorbimento diminuisce perché la sua concentrazione al sito di assorbimento diminuisce, mentre l'eliminazione aumenta perché la sua concentrazione sui siti di eliminazione aumenta (anche le cinetiche di eliminazione sono in genere di I ordine). Le variazioni della concentrazione plasmatica in ogni istante sono il risultato della differenza tra i flussi dovuti ai due processi: essa aumenta finché l'assorbimento è maggiore dell'eliminazione, smette di crescere (picco massimo) quando i due flussi si equivalgono e infine diminuisce quando i processi di eliminazione prevalgono. Vediamo cosa succede quando si somministra la stessa dose di farmaco in due muscoli a diversa irrorazione, ottenendo due velocità di assorbimento diverse (linee tratteggiate nella figura 50.3A e B). Nel caso di assorbimento più rapido, buona parte della dose sarà assorbita prima che una significativa eliminazione abbia luogo (Figura 50.3A). Il picco massimo di concentrazione plasmatica corrisponde al momento in cui i flussi di assorbimento e di eliminazione hanno pari valore (intercetta con le linee verticali nelle Figure 50.3A e C); esso avrà un valore elevato e la concentrazione plasmatica incomincerà a diminuire ben presto (Figura 50.3C). Nel caso di assorbimento più lento (Figura 50.3B), la concentrazione sale più lentamente, il picco massimo di concentrazione è più basso e viene raggiunto più tardi (Figura 50.3D). Questo esempio porta a due conclusioni valide per tutti i casi in cui una stessa dose di farmaco è assorbita con velocità diverse: *più lento è l'assorbimento, più basso e ritardato è il picco massimo di concentrazione plasmatica*.

Un'altra deduzione che può essere tratta da quanto detto è che il valore e il tempo del picco massimo, nonché la pendenza della fase di discesa della concentrazione plasmatica, dipendono dall'efficienza dei processi di eliminazione. Tutti questi parametri saranno quindi modificati in quei pazienti in cui siano presenti patologie che diminuiscano le capacità dei processi di eliminazione del

farmaco somministrato, come malattie renali o epatiche. Molto rilevante a questo riguardo è infine la possibilità che singoli individui (o gruppi) presentino una alterata velocità di eliminazione di specifici farmaci o classi di farmaci. In genere si tratta di alterazioni dell'efficienza nel metabolismo, dovute alla presenza di sottotipi particolari – o mutazioni geniche – di specifici enzimi. Nella maggior parte dei casi si tratta di isoforme meno efficienti – o inattive – di enzimi microsomiali epatici. Questi aspetti costituiscono una parte rilevante della problematica indicata con il termine di “farmacogenetica”, o più recentemente, grazie alla crescente disponibilità di dati sistematici su questo tipo di alterazioni, di “farmacogenomica”. L'incremento dei livelli di picco della concentrazione plasmatica, conseguente a inefficiente eliminazione, può essere responsabile di importanti effetti indesiderati, o chiaramente tossici. Il problema sarà ancora più rilevante ed evidente, ovviamente, in caso di somministrazioni ripetute del farmaco.

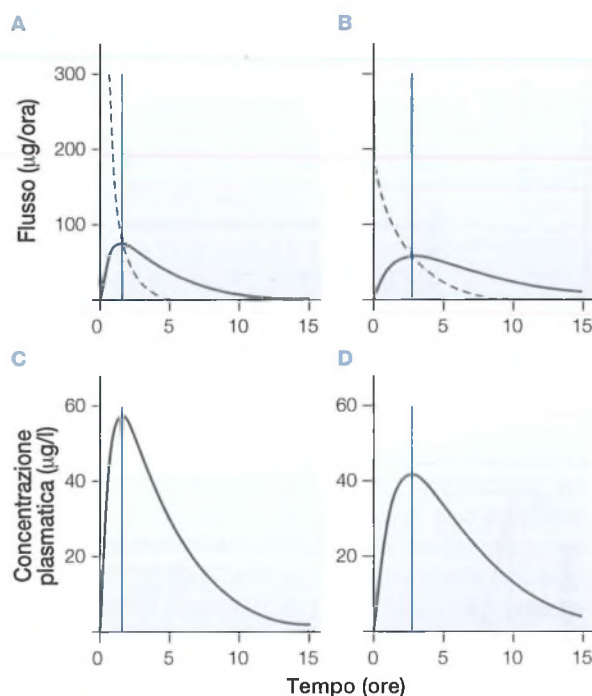


FIGURA 50.3 Variazioni dei flussi di eliminazione di un farmaco e delle conseguenti concentrazioni plasmatiche dovute a differenze della velocità di assorbimento. Il farmaco somministrato ha emivita di eliminazione di 166 minuti (corrispondente a una velocità di eliminazione del 25%/ora) e viene somministrato in due muscoli con irrorazione diversa. Nel primo caso (grafici A e C) l'assorbimento ha emivita di 28 minuti, nel secondo (grafici B e D) di 84 minuti. Si noti come le diverse velocità di assorbimento (linee tratteggiate in A e B) influenzino sia i flussi di eliminazione (linee continue in A e B) che le concentrazioni plasmatiche (C e D). Il tempo di picco, che corrisponde al momento in cui i flussi di assorbimento e di eliminazione hanno pari valore (linea verticale), è ritardato e ha valore minore quando l'assorbimento è più lento. Si noti anche che in tempi successivi al picco la concentrazione plasmatica è più alta se l'assorbimento è più lento. In alto i flussi di assorbimento (linea tratteggiata) e di eliminazione (linea continua). In basso le concentrazioni plasmatiche. Curve calcolate per $D = 350 \mu\text{g}$, $V_d = 5$ litri e $\text{clearance} = 1,25$ litri/ora.

BOX 1 Cinetiche di I ordine

Consideriamo una vasca con 10 litri di acqua colorata, da cui esce 1 litro al minuto che viene rimpiazzato da acqua pulita. Insieme all'acqua, in ogni minuto se ne va 1/10 del colorante presente cosicché, se all'inizio vi era una concentrazione di 8 g/l di colorante, dopo un minuto il valore è sceso a 7,2 g/l ($8 - 0,8$) e dopo un altro minuto 6,48 g/l ($7,2 - 0,72$) (A). Per semplicità è meglio ragionare in termini di frazione rispetto al valore iniziale (asse destro del grafico A): partendo dal valore unitario di 1, dopo un minuto si scende a $1 - 0,1 = 0,9$, dopo due minuti $0,9 - 0,09 = 0,81$ g, dopo tre 0,729, e dopo n minuti saremo a $0,9^n$. In generale, se una frazione k del colorante se ne va nell'unità di tempo (0,1 ogni secondo nel nostro esempio), ne resterà una frazione $(1 - k)^t$ dopo t secondi (A). Esiste un numero, chiamato e , tale che, se k è un numero molto piccolo ($k \ll 1$), $1 - k \approx e^{-k}$, cosicché la frazione di colorante che resta dopo t secondi sarà e^{-kt} . Il logaritmo in base e (log) di tale frazione sarà $-kt$. Per questo il numero e è detto "base dei logaritmi naturali", e se mettiamo in grafico il logaritmo della concentrazione del colorante (asse destro del grafico B) rispetto al tempo otterremo, per una concentrazione iniziale C_0 :

$$\log(C_0 \cdot e^{-kt}) = \log(C_0) - kt$$

ovvero una retta che parte dal logaritmo della concentrazione iniziale del colorante e scende con pendenza k rispetto al tempo (B): questo permette di valutare k con una regressione lineare o semplicemente come rapporto tra i due lati (a/b) del rettangolo della figura B. Il parametro k , frazione persa nell'unità di tempo, è detto *costante di eliminazione*; il suo inverso, $\tau = 1/k$ è detta *costante di tempo* dell'eliminazione, e la cinetica si può descrivere anche con l'equazione:

$$C = C_0 \cdot e^{-kt}$$

dove C è la concentrazione al tempo t , C_0 è la concentrazione iniziale, k è la costante di eliminazione ed e è la base dei logaritmi naturali.

Si può dimostrare che, considerando per ogni molecola di colorante quanto permane nella vasca e calcolandone la permanenza media, o *vita media*, questa vale esattamente τ .

Un altro utile parametro per definire l'andamento della concentrazione del colorante è il tempo necessario per dimezzarne la concentrazione: si vede nelle figure A e B, che il tempo in cui la concentrazione passa da 8 a 4, o da 4 a 2 o da 2 a 1 è sempre lo stesso. Il *tempo di dimezzamento* è quel valore di t per il quale C è la metà di C_0 , C/C_0 è $1/2$ e quindi:

$$e^{-kt} = 1/2, \text{ ovvero } t_{1/2} = \log(2)/k = \tau \cdot 0,693$$

il tempo necessario perché la concentrazione si dimezzi è detto $t_{1/2}$, o *emivita* ed è da solo un parametro

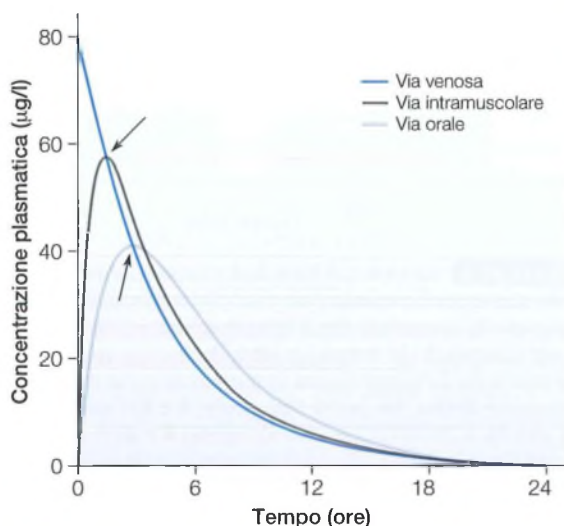


FIGURA 50.4 Andamento delle concentrazioni plasmatiche dello stesso farmaco somministrato per via intravascolare (massimo al tempo zero) o attraverso diverse vie extravascolari. Si noti che le curve per vie di assorbimento extravascolari mostrano picchi di concentrazione ritardati e più bassi. Al picco esse incrociano l'andamento conseguente alla somministrazione intravascolare (freccie) e di qui in poi determinano concentrazioni più alte.

La velocità di assorbimento varia a seconda della via di somministrazione utilizzata

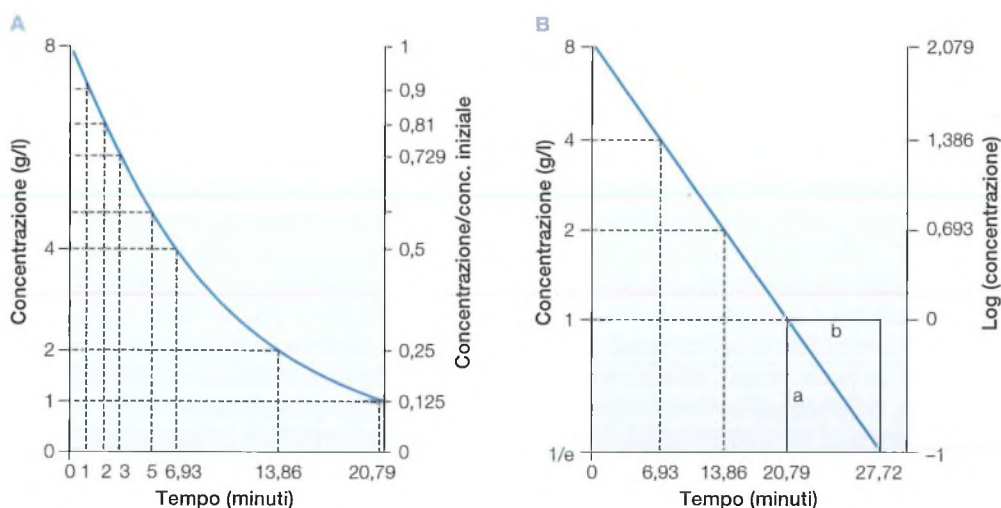
La concentrazione al picco di una dose di farmaco somministrata in un singolo bolo per via endovenosa è sempre più alta di quella ottenibile somministrando la stessa dose per una qualunque via extravascolare. Come descritto nella tabella 50.2, la velocità di assorbimento di un farmaco dipende da variabili legate al farmaco stesso e/o dalle caratteristiche funzionali dell'area assorbente. Di conseguenza, la velocità di assorbimento di un farmaco attraverso ciascuna via di somministrazione può essere determinata in modo preciso solo sperimentalmente. Tuttavia, per farmaci con coefficiente di ripartizione intermedio, si può ragionevolmente prevedere che la velocità dell'assorbimento attraverso le vie intramuscolare, sottocutanea e enterale sarà via via più lenta. Per questi farmaci, la somministrazione di una singola dose produrrà concentrazioni plasmatiche il cui andamento è mostrato nella figura 50.4. È importante ricordare che vi può essere un intervallo di tempo considerevole fra la somministrazione e l'inizio dell'assorbimento. Questo può ad esempio accadere per farmaci somministrati in confetti rivestiti di materiale resistente ai succhi gastrici e

sufficiente a descrivere una cinetica di questo tipo; nell'esempio riportato nei grafici, $t_{1/2}$, è uguale a 6,93 minuti. Dal $t_{1/2}$, si possono calcolare facilmente:

$$\text{vita media: } \tau = 1,443 \cdot t_{1/2} \quad \text{costante di eliminazione: } k = 0,693/t_{1/2}$$

È da notare che l'emivita e la vita media sono fra loro proporzionali e non sinonimi!

Una cinetica di questo tipo si definisce *cinetica di I ordine* perché la quantità eliminata in ogni istante è proporzionale alla concentrazione alla prima potenza; se invece una quantità costante (proporzionale a C elevato alla potenza 0) viene eliminata in ogni istante, come succede per un processo di trasporto attivo saturato, la cinetica viene detta di *ordine zero*. Si può osservare che, sebbene possano apparire più complesse, le cinetiche di I ordine sono molto più frequenti nei processi dominati da diffusione e altri fenomeni passivi, sono cioè molto più naturali, che non le cinetiche di ordine zero, le quali richiedono la presenza di processi di trasporto attivi. Si noti peraltro che un farmaco eliminato per trasporto attivo mostra una cinetica di eliminazione di ordine zero solo se il trasporto attivo è saturato e lavora sempre a pieno regime, mentre sotto saturazione il trasporto tende a divenire proporzionale al legame tra farmaco e trasportatore e perciò alla concentrazione del farmaco, ricadendo nel caso più comune di una cinetica di I ordine.



destinati a sciogliersi a livello intestinale. Come verrà trattato in dettaglio nel Capitolo 51, dopo somministrazione extravascolare la concentrazione plasmatica sale fino a un massimo (picco): la concentrazione al momento del picco è uguale a quella che avremmo avuto, in quello stesso momento, somministrando la stessa dose direttamente in circolo (Figura 50.4). Nel caso della somministrazione extravascolare però vi è ancora una parte del farmaco che deve essere assorbita e quindi la concentrazione plasmatica dal momento del picco in poi sarà maggiore di quella prodotta dalla somministrazione endovenosa (Figura 50.4). Ovviamente, se la biodisponibilità è ridotta impiegando la via extravascolare, i valori plasmatici possono mantenersi sempre più bassi di quelli ottenuti per somministrazione endovenosa.

Vi sono ovvie implicazioni in quanto mostrato nella figura: utilizzando vie di somministrazione diverse per una stessa dose di farmaco si può evitare di indurre concentrazioni tossiche e si può prolungare la durata dell'effetto terapeutico. Da notare anche che se la velocità di assorbimento è troppo lenta, la concentrazione plasmatica del farmaco potrebbe non raggiungere mai il livello minimo della finestra terapeutica.

Se la velocità di assorbimento del farmaco è molto lenta,

come nel caso di somministrazione di formulazioni "ritardo", la sua concentrazione plasmatica può persistere a livelli utili per un periodo di tempo molto più lungo di quello prevedibile in base alla velocità con cui esso è normalmente eliminato; in questo caso, il fattore che controlla la durata dell'effetto farmacologico è soprattutto la velocità del processo di assorbimento. Ad esempio, 300.000 unità di penicillina G somministrate im producono un picco massimo di circa 1 $\mu\text{g/ml}$ in 1-3 ore, dopo 1 giorno la concentrazione plasmatica è di circa 0,1 $\mu\text{g/ml}$ e dopo 2 giorni è di 0,02 $\mu\text{g/ml}$; invece, somministrando 1.200.000 unità di penicillina benzatina, che è assorbita molto lentamente, si ottiene una concentrazione plasmatica di 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dopo un giorno mentre il valore di 0,02 $\mu\text{g/ml}$ viene raggiunto solo dopo 14 giorni. Nelle cinetiche in cui il fattore limitante è la velocità di assorbimento, la quantità di farmaco presente nel corpo del paziente (a parte il sito di somministrazione) è sempre una minima parte della dose somministrata.

I livelli plasmatici di un farmaco dipendono dalla dose somministrata

In ciascun momento, la concentrazione di un farmaco dipende dalla differenza tra quantità assorbita e quantità

eliminata. A parità di via di somministrazione, i livelli plasmatici di un farmaco sono perciò dipendenti dalla dose somministrata. Infatti se si somministra una dose doppia, in ciascun momento la quantità di farmaco assorbita è doppia (salvo saturazione dei meccanismi di assorbimento): questa è la caratteristica delle cinetiche di I ordine, ovvero la percentuale di farmaco assorbita e quella di farmaco eliminata nell'unità di tempo, k_a e k_e rispettivamente, sono costanti e pertanto la quantità assorbita/eliminata è sempre proporzionale alla quantità di farmaco ancora da assorbire/eliminare. Per una dose doppia, la quantità di farmaco assorbita è doppia, la quantità che viene eliminata è doppia, e di conseguenza anche la concentrazione plasmatica, che è data dalla differenza tra quantità assorbita e quantità eliminata, è doppia.

Drug delivery Formulazioni per regolare tempi e sedi del rilascio del farmaco

Messaggio fondamentale della trattazione fin qui svolta è che la via e la modalità di somministrazione non sono indifferenti al fine di determinare le concentrazioni desiderate sull'organo bersaglio e gli andamenti opportuni di tali concentrazioni nel tempo.

Come si è visto, le modalità di assorbimento determinano altezza e durata dei picchi ematici; affronteremo in seguito la problematica delle somministrazioni ripetute, ma già appare chiaro come in tal caso le oscillazioni delle concentrazioni ematiche saranno analogamente influenzate dalle modalità di somministrazione. Soprattutto per i farmaci rapidamente eliminati, la cinetica di assorbimento può anche determinare la durata degli effetti del farmaco. Già da molti anni sono per questo state sviluppate formulazioni che rilascino il farmaco al plasma con cinetiche controllate. Tra queste, particolare successo hanno avuto le preparazioni transdermiche, che sfruttano soprattutto la lentezza dell'assorbimento attraverso la cute cheratinizzata, e le preparazioni "ritardo" che, grazie alla inclusione del farmaco in matrici con caratteristiche adatte di solubilità, permettono un rilascio lento e regolare, anche per periodi molto prolungati.

Nell'ultimo ventennio si è assistito a un rigoglioso sviluppo di innovazioni tecnologiche in questo campo, che ha preso il nome di "drug delivery", ovvero tecnologie di "consegna" del farmaco.

Dalla semplice idea di un rilascio rallentato del farmaco in funzione della modalità e della sede di applicazione, e della superficie di contatto degli strumenti di applicazione (cerotti, pellet sottocutanei ecc.), si è passati allo sviluppo di "veicoli" sempre più raffinati, per rispondere a diverse problematiche (Tabella 50.9).

■ *Approcci transdermici e transmucosali*

Abbiamo già citato i sistemi transdermici di rilascio prolungato ("cerotti") per farmaci come estrogeni, nitroglicerina e scopolamina. Per farmaci peptidici o proteici sono stati sviluppati sistemi di rilascio sottocutaneo (pellet o

TABELLA 50.9 Obiettivi delle tecniche di "drug delivery"

Protezione del farmaco dalla degradazione e stabilizzazione
Preparazione di farmaci che richiedono somministrazione parenterale in modo che siano efficacemente assorbiti per os o attraverso vie cutanee o inalatorie
Prolungamento della vita in circolo del farmaco
Indirizzamento del farmaco a specifici organi tessuti o tipi cellulari
Rilascio regolato del farmaco in funzione di condizioni locali o attraverso stimoli elettrici/magnetici

pompe osmotiche), che però hanno il difetto di essere sistemi invasivi e non sempre garantiscono la stabilità di queste molecole. Più recentemente sono stati messi a punto metodi di somministrazione transdermica basati su approcci biolistici (microproiettili) e iontoforetici.

Un approccio alternativo è quello di inalare tali farmaci per via nasale o polmonare.

La via nasale è particolarmente adatta per l'autosomministrazione. La mucosa nasale è più permeabile di quella del tratto gastroenterico, è riccamente vascolarizzata e il sangue venoso raggiunge direttamente il circolo sistemico senza primo passaggio epatico. È possibile preparare il farmaco con polimeri "bioadesivi" che tendono a fissarsi sulla mucosa e a rilasciare il farmaco per periodi prolungati, e con sostanze che proteggono il farmaco e ne facilitano l'assorbimento (sali biliari, surfattanti, fosfolipidi, o ciclodestrine, che in particolare facilitano il passaggio paracellulare).

Anche l'inalazione polmonare è molto agevole, evita l'uso di aghi e sfrutta una amplissima superficie assorbente. Oltre che per l'applicazione topica di farmaci, può essere usata per la somministrazione sistemica di farmaci peptidici, proteine e ormoni (narcotici, ACE-inibitori, insulina, calcitonina, eparina, antitripsina, interferone, FSH, vaccini e terapie geniche). Una promettente innovazione rispetto all'aerosol, sia tradizionale che attraverso erogatori dosati, è l'inalazione di farmaci preparati in polveri secche (DPI, *Dry Powder Inhalation*), che garantiscono una maggiore stabilità di farmaci peptidici e proteine.

■ *Polimeri e microparticelle permettono di proteggere il farmaco e regolarne il rilascio*

Negli ultimi anni un enorme sviluppo ha caratterizzato la ricerca nel campo dei polimeri per drug delivery.

L'intrappolamento del farmaco in una matrice o capsula polimerica permette di proteggerlo dalla degradazione, regolare la velocità del suo rilascio ai liquidi corporei e in alcuni casi consegnarlo selettivamente a tessuti o tipi cellulari specifici.

Dopo i primi approcci con polimeri naturali, quali collagene e cellulosa, sono stati sviluppati polianidridi, poliesteri, poliacrilati e poliuretani, nei quali è possibile determinare la velocità di degradazione della matrice (e di rilascio del farmaco) in funzione della presenza di eteroatomi (diversi dal carbonio) e delle condizioni di polimerizzazione.

I polimeri possono essere impiegati per produrre microsferiche, che svolgono l'azione di piccoli serbatoi conte-

menti il farmaco (incapsulamento) o di matrici nelle quali il farmaco è fisicamente intrappolato nel reticolo del polimero. Un aspetto rilevante è che in alternativa al rilascio attraverso semplice diffusione del farmaco, si possono preparare polimeri biodegradabili (dalla superficie o in massa) che in seguito a idrolisi rilasciano il farmaco e si riducono a composti (acido lattico e glicolico) che possono essere degradati completamente ad acqua e CO₂. Oltre a semplici polimeri, è possibile sintetizzare eteropolimeri. Se si combinano monomeri idrofili e lipofili, si ottengono micelle (di dimensioni nell'ordine dei nanometri, che possono contenere singole molecole di farmaco), che proteggono il farmaco e lo possono consegnare in modo mirato. Ad esempio, il legame di zuccheri in superficie indirizza le micelle a glico-recettori presenti sulle membrane plasmatiche: questo approccio è stato usato con successo per "consegnare" l'antitumorale doxorubicina a cellule di tumori solidi.

Una promettente possibilità nasce dalla sintesi di polimeri elettroattivi, che si comportano da sistemi di rilascio molecolare sensibili al mezzo circostante, perché il rilascio è controllato dal flusso di contro-ioni (dopanti). Ancora più versatili appaiono i polimeri resistenti ad ambienti acidi, idrofili ("idrogel"), che rilasciano le molecole intrappolate quando si "gonfiano"; e questo avviene, a seconda della composizione chimica, in seguito a cambiamenti di pH, applicazione di campi elettrici o magnetici, o ultrasuoni, il che permette di regolare attivamente la "consegna" del farmaco sul sito d'azione. I polimeri con scheletro di poliacrilato sono anche superassorbenti e bioadesivi (aderiscono alle pareti mucose, rilasciando lentamente il contenuto). Tra gli impieghi degli idrogel, una soluzione particolarmente interessante è l'intrappolamento di insulina in una membrana di idrogel a cui è fissato l'enzima glucosio-ossidasi. In presenza di alto glucosio l'enzima produce acido gluconico e un conseguente abbassamento di pH, che determina il rilascio del farmaco proprio quando ce n'è bisogno.

Un caso particolare, infine, è costituito dalla molecola di fullerene (60 atomi di carbonio organizzati come in un pallone da calcio), che presenta una cavità interna nella quale è possibile alloggiare atomi metallici: sono state costruite molecole contenenti atomi radioattivi, allo scopo di "consegnarli" specificamente a tessuti tumorali limitando così l'esposizione degli altri tessuti alle radiazioni.

I liposomi, che sembravano deludenti, ora aprono nuove prospettive

I liposomi sono vescicole di doppio strato di fosfolipidi. Molte speranze si erano puntate nell'ultimo ventennio del secolo scorso su queste microstrutture come veicolo protettivo per i farmaci, forse anche indirizzabile a tessuti specifici. I liposomi infatti lasciano il circolo ematico in sedi specifiche, e specialmente attraverso i vasi in attiva proliferazione, al margine di avanzamento dell'angiogenesi; dovrebbero pertanto risultare particolarmente adatti a proteggere farmaci antitumorali e consegnarli in sede, riducendo l'esposizione degli altri tessuti.

Nonostante qualche risultato positivo con l'antitumorale

doxorubicina incapsulato in liposomi, buona parte di queste speranze sono state deluse dalla prima generazione di liposomi, che sono risultati a vita breve, perché vengono rapidamente legati dalle opsonine e degradati dai fagociti mononucleati del sistema reticolo-endoteliale (SRE). In pratica, sono risultati utili solo per l'indirizzamento di farmaci proprio al SRE.

I liposomi di ultima generazione sono "stericamente stabilizzati" grazie all'aggiunta di poietilenglicole (PEG) che forma un alone idrofilo e repelle le opsonine. Aggirando così la degradazione da parte del SRE costituiscono un buon sistema per il rilascio prolungato e l'indirizzamento specifico del farmaco ("targeting").

L'indirizzamento preferenziale a regioni di neoangiogenesi costituisce un meccanismo di *targeting passivo* dei liposomi, che è stato impiegato con risultati interessanti con i liposomi stabilizzati.

Nella terapia antitumorale, il targeting passivo dei liposomi porta a un significativo accumulo del farmaco nei tumori solidi.

L'antitumorale doxorubicina incapsulato in liposomi, ad esempio, appare raggiungere nell'infiltrato tumorale concentrazioni oltre dieci volte più elevate che negli interstizi di altri tessuti. L'approccio si rivela particolarmente appropriato alla terapia del sarcoma multiplo di Kaposi, a localizzazione cutanea, perché tra le caratteristiche del targeting passivo dei liposomi vi è una tendenza a concentrarsi nei tessuti cutanei.

Un'analoga applicazione dei liposomi, che ne sfrutta le proprietà di targeting passivo, è l'impiego in caso di infezione, sfruttando l'aumento della permeabilità nella zona infiammata per localizzare selettivamente i liposomi e il loro carico farmacologico.

L'obiettivo più ambizioso degli approcci di drug delivery resta comunque quello di consegnare il farmaco selettivamente a tessuti o tipi cellulari specifici. L'espressione selettiva di antigeni di superficie costituisce la premessa per immaginare di eseguire un *targeting attivo*, specifico del farmaco sulla cellula bersaglio, legando anticorpi alla superficie di liposomi. Con i liposomi classici questa è risultata una via impraticabile, perché quando sono legati ad anticorpi essi vengono ancor più rapidamente captati ed eliminati dai fagociti del SRE.

Il legame di anticorpi a liposomi stabilizzati risulta tecnicamente un po' più problematico, ma si sono già ottenuti i primi promettenti risultati sperimentali: liposomi legati ad anticorpi anti-CD34 appaiono in grado di consegnare specificamente farmaci alle cellule linfoidi che esprimono tale antigene di superficie; analogamente, e caricando con il farmaco antitumorale 5-fluorodeossiridina liposomi legati ad anti-CC532, un antigene del carcinoma del colon di ratto, si sono ottenute risposte terapeutiche molto incoraggianti.

In linea di principio il targeting specifico attraverso liposomi promette di colmare una importante lacuna dell'armamentario terapeutico, fornendo uno strumento per attaccare selettivamente le metastasi tumorali, i tumori multipli e forme di leucemia e mieloma oggi difficilmente trattabili.

TABELLA 50.10 Approcci di "drug-delivery" regolata e selettiva: esempi di applicazioni terapeutiche

Obiettivo		Approccio	Esempio
Targeting (consegna mirata)	Organo	Polimeri bioadesivi	Trattamento patologie della mucosa gastrointestinale
	Tessuto	Liposomi con tropismo cutaneo	Tumori cutanei
	Tipo cellulare	Immuno-liposomi contro antigeni specifici	Trattamento tumori solidi e circolanti
Controllo cinetico	Protezione dalla degradazione	Aerosol nasale con adiuvanti polveri secche inalabili, liposomi, polimeri	Farmaci soggetti a metabolismo epatico proteine e peptidi poco stabili in soluzione
	Rilascio lento/ritardato	Sistemi di rilascio transdermico (cerotti) polimeri, microparticelle, liposomi	Nitroglicerina (antianginoso), scopolamina, antitumorali
	Rilascio al bisogno	Sistemi impiantabili diffusivi o a pompa polimeri sensibili al pH, al campo elettrico o magnetico, a contro-ioni	Rilascio prolungato di anticoncezionali, insulina in polimeri sensibili al pH con legato enzima che ossida il glucosio

La complessa relazione tra tecniche di gene therapy e di drug delivery

A conclusione di questo capitolo è interessante considerare la duplice relazione che lega due importanti e promettenti aree di sviluppo della terapia: terapia genica e drug delivery (Tabella 50.10).

Da un lato è ovvia l'importanza di poter preservare nell'organismo virus plasmidi e acidi nucleici fino a poterli "consegnare", in modo possibilmente selettivo, alle cellule bersaglio. A questo scopo, a seconda che si persegua l'espressione locale o sistemica di sequenze geniche e si utilizzino o meno virus come vettori, si possono impiegare molte delle tecniche fin qui descritte:

dalla inalazione per aerosol o polvere secca, ad approcci transdermici come l'elettroporazione, alla somministrazione orale indirizzata verso cellule dell'epitelio gastroenterico, alle preparazioni deposito biodegradabili e alle pompe impiantabili.

D'altro lato, però, in alcuni casi il rapporto mezzo/fine si inverte e le tecniche di terapia genica possono a loro volta essere considerate sofisticatissimi metodi di drug delivery, nei quali anziché farmaci vengono somministrati acidi nucleici, e le sostanze terapeutiche codificate dai geni somministrati vengono prodotte in vivo, e magari solo nei tessuti e dalle cellule che desideriamo esporre al trattamento.

TAKE HOME MESSAGE

- È possibile somministrare i farmaci direttamente nel circolo ematico o attraverso altre vie. Nel secondo caso la velocità dell'assorbimento determina la rapidità con cui salgono le concentrazioni plasmatiche e i livelli di picco.
- La facilità di assorbimento attraverso le diverse vie dipende da numero e caratteristiche delle barriere da superare, influenza la biodisponibilità del farmaco, e può determinare una azione sistemica oppure solo locale (topica).
- Le vie di assorbimento attraverso l'intestino (vie enterali), che sfruttano la facilità di somministrazione e l'enorme superficie assorbente, possono essere influenzate da metabolismo diretto da parte del fegato prima di raggiungere il circolo sistemico (effetto di primo passaggio).
- È possibile mantenere concentrazioni efficaci del farmaco per periodi prolungati, regolare l'assorbimento in funzione di specifiche situazioni funzionali e/o favorire l'indirizzamento del farmaco a specifici tessuti o gruppi cellulari, impiegando tecniche di preparazione farmaceutica che regolino la velocità, le modalità e/o la sede cellulare del rilascio del principio attivo (drug delivery).

Bibliografia essenziale

- Attar M, Lee VH. Pharmacogenomic considerations in drug delivery. *Pharmacogenomics* 2003;4:443-61.
- Dressman JB, Lennernäs H (eds). *Oral Drug Absorption: Protection and Assessment*, Drugs and the pharmaceutical Science, vol. 106. New York: Marcel Dekker, 2000.
- Harrington KJ, Syrigos KN, Vile RG. Liposomally targeted cytotoxic drugs for the treatment of cancer. *J Pharm Pharmacol* 2002;54:1573-600.
- Mehvar R. Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic perspectives. *Curr Pharm Biotechnol* 2003; 4:283-302.
- Sloan KB, Wasdo S. Designing for topical delivery: prodrugs can make the difference. *Med Res Rev* 2003;23:763-93.

Distribuzione ed eliminazione dei farmaci

CAPITOLO

51

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

Obiettivi formativi

- Comprendere le basi biologiche dei processi di eliminazione dei farmaci
- Conoscere i parametri più significativi che consentono di descrivere in modo quantitativo le cinetiche di distribuzione e di eliminazione dei farmaci
- Comprendere i concetti di volume apparente di distribuzione e di emivita
- Comprendere come le patologie possono interferire sulla farmacocinetica dei farmaci

Entrato nell'organismo, il farmaco si distribuisce ai vari tessuti e viene eliminato per metabolizzazione o escrezione. Nel grafico semilogaritmico della figura 51.1 è mostrato l'andamento della concentrazione plasmatica della lidocaina, un farmaco antiaritmico, dopo somministrazione di un bolo di 150 mg per via endovenosa. È evidente che la concentrazione plasmatica decade con due velocità diverse: vi è una fase iniziale di rapida caduta seguita da una fase tardiva e più lenta.

Queste due fasi vengono classicamente definite *fase di distribuzione* e *fase di eliminazione*. La caduta della concentrazione plasmatica che si ha durante la fase di distribuzione è dovuta al fatto che la lidocaina esce dal letto vascolare per distribuirsi nei vari tessuti dell'organismo (compreso quello cardiaco che rappresenta il bersaglio terapeutico) finché le concentrazioni nel sangue e negli altri tessuti si equilibrano. Durante la fase di eliminazione la concentrazione plasmatica diminuisce invece per azione dei meccanismi di metabolizzazione ed escrezione che eliminano il farmaco dal corpo.

L'ampiezza della caduta dei livelli plasmatici del farmaco durante la fase di distribuzione è un indice della capacità del farmaco di uscire dai vasi, e del volume nel quale si deve distribuire; la velocità della discesa durante la fase di eliminazione è invece un indice dell'efficienza dei processi di eliminazione dell'organismo. I due processi non avvengono separatamente nel tempo, ed è possibile distinguerli come nella figura 51.1 solo se uno è molto più rapido dell'altro; per alcuni farmaci, la fase di distribuzione (cioè il raggiungimento dell'equilibrio tra concentrazioni plasmatica ed extraplasmatica) può durare un periodo di tempo considerevole e non essere ricono-

scibile nell'andamento temporale della concentrazione plasmatica. Una distinzione tra le due fasi è comunque utile, soprattutto a fini didattici, perché le due fasi sono governate da fenomeni almeno in parte diversi.

Distribuzione

Per poter prevedere con una certa precisione l'entità dell'effetto di un farmaco su un particolare organo, occorrerebbe misurarne la concentrazione nell'organo stesso. Ciò è possibile nell'animale ma quasi impossibile nell'uomo, dove l'unico dato facilmente ottenibile è la concentrazione plasmatica. Tuttavia quest'ultima può essere utile per ottenere una stima adeguata della concentrazione del farmaco nel compartimento di interesse se si è a conoscenza della velocità e dell'entità dei fenomeni di distribuzione. Entrambi questi parametri variano a seconda del farmaco e del compartimento d'interesse.

Il termine *distribuzione* definisce quella serie di fenomeni che sono alla base del trasferimento di farmaco tra i vari compartimenti che costituiscono l'organismo. Gli aspetti fondamentali della problematica sono due, uno di *equilibrio* e uno *cinetico*: da un lato le concentrazioni di equilibrio che tendono a stabilirsi nei diversi compartimenti dell'organismo, dall'altro la velocità con cui un farmaco si distribuisce tra il sangue e i tessuti.

L'aspetto cinetico a prima vista appare piuttosto semplice: seguendo una facile regola generale, la velocità con cui ogni tessuto si equilibra rispetto al plasma è data, in linea di principio, dal rapporto tra volume del tessuto e flusso ematico. Come vedremo, però, la questione risulta più

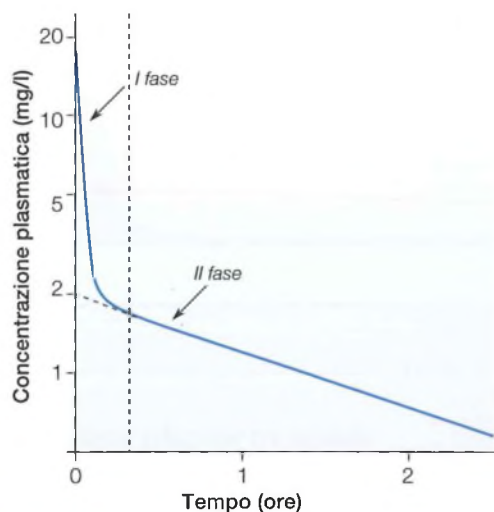


FIGURA 51.1 Grafico semilogaritmico che illustra l'andamento della concentrazione plasmatica della lidocaina a seguito di somministrazione di 150 mg in bolo endovenoso. La prima fase di discesa della concentrazione plasmatica è principalmente dovuta alla distribuzione del farmaco dal plasma ai tessuti. La seconda fase riflette l'eliminazione del farmaco dall'organismo. L'estrapolazione a zero della fase di eliminazione fornisce una concentrazione stimata a tempo zero di 2 mg/l, che indica un $V_d = (150 \text{ mg}) / (2 \text{ mg/l}) = 75 \text{ l}$.

complessa, proprio a causa del fatto che il farmaco tende a raggiungere nei diversi tessuti concentrazioni diverse; inoltre, vari fattori possono ostacolare la diffusione dai capillari all'interstizio di particolari tessuti.

■ I tessuti hanno diversa avidità per il farmaco

Il fatto che il farmaco tenda a raggiungere concentrazioni di equilibrio diverse nei vari organi e tessuti non è forse subito ovvio e intuitivo. D'altra parte, è indubitabile che la concentrazione di qualunque farmaco tenderà a essere uguale nell'acqua plasmatica e nell'acqua interstiziale di ogni tessuto; poiché però, in aggiunta alla quota in soluzione acquosa, parte del farmaco potrà legarsi in varia misura a proteine o macromolecole in genere, diffondere in vario grado nelle membrane cellulari e accumularsi in quantità diversa nelle cellule del tessuto, risulta evidente che la concentrazione totale presente nel plasma e quella presente nell'interstizio di un certo tessuto – o ancor più nel tessuto nel suo complesso – potranno essere sensibilmente diverse.

La problematica risulta complicata dal fatto che le concentrazioni nel plasma variano nel tempo, e alcuni compartimenti a lentissimo equilibrio, come il tessuto adiposo, a scarsissima perfusione, possono non riuscire a equilibrarsi con il plasma prima che il farmaco venga eliminato, o seguire le concentrazioni plasmatiche con notevole ritardo. Proprio per questo è però utile tenere chiaramente separati, da un punto di vista concettuale, i due aspetti cinetico e d'equilibrio. Concentriamoci dunque qui su quest'ultimo.

Poiché la composizione biochimica del plasma, degli spazi interstiziali e del citoplasma è in buona parte diversa,

e alcuni tessuti possono essere ricchi in lipidi o altre macromolecole a cui i farmaci possono legarsi, ogni farmaco può ripartirsi in modo diverso tra plasma e ogni tessuto. In tessuti ricchi di lipidi, ad esempio, all'equilibrio i farmaci lipofili saranno presenti nell'acqua interstiziale in concentrazione uguale a quella del *farmaco libero nel plasma*, ma in concentrazione più alta nelle membrane cellulari e nella componente lipidica del tessuto. La concentrazione totale del farmaco nel tessuto risulta pertanto alta, e il tessuto dimostra una elevata *avidità* per il farmaco. L'avidità di un tessuto per un farmaco viene spesso indicata con la notazione k_p , e il suo valore è dato, per ogni tessuto, dal rapporto tra concentrazione totale tessutale e concentrazione plasmatica, all'equilibrio.

Pur rimandando a più avanti la discussione degli aspetti cinetici, possiamo già affermare che per i tessuti che riescono a equilibrarsi con il plasma, una volta raggiunto l'equilibrio il *rapporto di concentrazione tessuto/plasma rimarrà costante* (benché tutte le concentrazioni diminuiscono via via a causa dei processi di eliminazione) finché non viene somministrata una nuova dose di farmaco, in quanto è determinato solo dalla k_p del tessuto per il farmaco.

Per comprendere chiaramente i fenomeni di distribuzione nell'organismo è utile approfondire due aspetti cruciali: il concetto di volume di distribuzione apparente e il legame dei farmaci alle proteine plasmatiche.

Per quanto detto, la quantità di farmaco che troveremo, all'equilibrio, in un dato tessuto non dipenderà solo dal suo volume, ma anche dalla k_p del tessuto. Dal punto di vista della distribuzione del farmaco all'equilibrio – e come vedremo anche dal punto di vista cinetico – il tessuto si comporta dunque come se avesse un volume effettivo diverso da quello reale. Chiamiamo questo volume virtuale *volume apparente di distribuzione*.

Nella discussione precedente abbiamo accennato dapprima alla concentrazione del farmaco libero nel plasma e poi alla "concentrazione plasmatica". È importante considerare che si tratta di due valori spesso diversi. Molti farmaci hanno una limitata solubilità nell'acqua plasmatica e una più o meno marcata affinità per le proteine plasmatiche – albumina, globuline ecc. Poiché a equilibrarsi con i tessuti è la quota libera del farmaco, che può diffondere attraverso le pareti dei capillari, questo comporta che la concentrazione "vista" dai tessuti è quella del farmaco libero, e l'avidità del tessuto per il farmaco risulta influenzata – anche pesantemente – dal legame con le proteine plasmatiche. Anche questo aspetto va dunque analizzato con attenzione.

Il volume apparente di distribuzione

Possiamo considerare l'organismo come costituito da un certo numero di compartimenti distinti dal punto di vista funzionale. Tra questi riconosciamo almeno tre compartimenti idrici principali: acqua plasmatica, liquido interstiziale (extracellulare) e liquidi intracellulari. In un individuo adulto magro (70 kg) circa il 60% del peso corporeo è costituito da acqua (42 l); l'acqua plasmatica

rende conto di circa il 4% del peso corporeo (3 l), i liquidi extracellulari di circa il 16% (11 l) e i liquidi intracellulari di circa il 40% (28 l). Questi compartimenti idrici andrebbero ulteriormente suddivisi, dal punto di vista funzionale, in quanto i diversi organi e tessuti hanno caratteristiche di perfusione, composizione e volume diverse.

Come abbiamo già visto, il rapporto tra le concentrazioni del farmaco in un tessuto e nel sangue all'equilibrio (k_p del tessuto) è diverso da uno per moltissimi farmaci e può anche essere diverso da tessuto a tessuto per lo stesso farmaco. In ogni sede parte del farmaco sarà anche presente, in funzione del suo coefficiente di ripartizione, nelle membrane cellulari e nei depositi lipidici; esso si può inoltre legare in parte a proteine plasmatiche e altri accettori. La sua concentrazione non sarà quindi la stessa nei vari "compartimenti".

Poiché la concentrazione è definita dal rapporto quantità/volume, dovremmo poter calcolare il volume in cui il farmaco si è distribuito, all'equilibrio, come rapporto tra dose di farmaco somministrata (*quantità*) e concentrazione plasmatica misurata (*quantità/litro*): ciò che otterremo però non sarà in realtà il volume d'acqua dell'organismo, bensì un volume di distribuzione *apparente*, V_d , di volta in volta diverso a seconda del coefficiente di ripartizione del farmaco, del suo legame con le proteine plasmatiche e dell'avidità per esso dei vari tessuti.

Il V_d mette in relazione la concentrazione plasmatica con la quantità di farmaco presente nell'organismo

Conoscere il volume di distribuzione apparente di un farmaco è importante per poter stimare quale sarà la sua concentrazione plasmatica dopo che esso si è completamente distribuito nei vari tessuti. Infatti il volume apparente di distribuzione è, per definizione, dato dalla seguente formula:

$$V_d = \frac{\text{Quantità di farmaco nel corpo all'equilibrio di distribuzione}}{\text{Concentrazione plasmatica del farmaco}}$$

Tranne alcune (ma importanti) eccezioni, il tempo necessario per il raggiungimento dell'equilibrio di distribuzione è molto minore di quello necessario per una sostanziale eliminazione del farmaco somministrato. È possibile stimare il valore di V_d da una curva come quella mostrata in figura 51.1: durante la fase di eliminazione il farmaco è distribuito in tutto il suo volume apparente di distribuzione, e pertanto la estrapolazione della retta della fase di eliminazione fino al tempo $t = 0$ darà la concentrazione plasmatica C_p che si otterrebbe se l'intera dose somministrata D raggiungesse l'equilibrio di distribuzione istantaneamente.

Il volume apparente di distribuzione si calcola dalla formula:

$$V_d = D/C_p$$

Ogni tessuto/organo ha un suo V_d

Ogni compartimento dell'organismo contribuisce a determinare il valore complessivo di V_d .

Da quanto esposto sopra e dalla definizione di k_p di un tessuto (rapporto tra le concentrazioni del farmaco nel tessuto e nel sangue all'equilibrio) consegue che il volume apparente di ogni compartimento non è che il suo volume reale moltiplicato per il valore di avidità del compartimento per il farmaco in esame, k_p .

Il V_d dell'organismo non è altro che la somma del volume plasmatico più il volume apparente di distribuzione di tutti i compartimenti. Come riportato a titolo di esempio nella tabella 51.1, il V_d varia enormemente tra farmaco e farmaco. Se il V_d di un farmaco è molto elevato (superiore al volume dell'acqua corporea), vuol dire che uno o più tessuti accumulano il farmaco (k_p maggiore di 1), ovvero si comportano da deposito.

I motivi per cui alcuni tessuti fungano da deposito possono essere di facile comprensione; ad esempio, i farmaci lipofili tendono ad accumularsi nei tessuti ricchi di grassi (adiposo e SNC), mentre i metalli pesanti si legano al tessuto osseo interagendo ed entrando a far parte dei cristalli di idrossiapatite e causando lesioni al tessuto

BOX 1 Un semplice esempio per capire il volume apparente di distribuzione

La concentrazione (C) di un soluto è la sua quantità (Q) per unità di volume (V), ovvero $C = Q/V$. Si può stimare il volume di un recipiente mettendovi un colorante in quantità nota, misurandone la concentrazione dal colore della soluzione, e calcolando il volume con la formula $V = Q/C$. Se il recipiente contiene acqua e olio, otterremo stime di volume molto diverse misurando la concentrazione nella fase acquosa, o in quella oleosa, o in una emulsione dei due. Dalla concentrazione nell'emulsione stimeremo sempre correttamente il volume del recipiente. Misurando nella fase acquosa, per un composto molto idrofilo stimeremo un volume uguale a quello della fase acquosa, mentre per un composto molto lipofilo stimeremo un volume enorme (C molto piccola perché il composto è stato "sequestrato" dall'olio). In pratica misureremo il volume di acqua nel quale il colorante dovrebbe distribuirsi per determinare la concentrazione finale che si riscontra nella fase acquosa, che viene definito *volume apparente di distribuzione*, V_d . Questa misura è di grande utilità operativa perché ci permette di trascurare la presenza di lipidi in un compartimento, "sostituendoli" con un volume di acqua "equivalente" ai fini della distribuzione del composto in esame. È ovvio, ma importante, che il V_d può essere diverso per composti diversi.

TABELLA 51.1 Eterogeneità del V_d tra farmaci diversi

Farmaco	V_d in litri/kg	Farmaco	V_d in litri/kg
Clorochina	130	Carbamazepina	1,5
Amiodarone	66	Prednisolone	1,5
Imipramina	23	Ranitidina	1,3
Clopromazina	21	Ciclosporina	1,2
Amiloride	17	Diazepam	1,1
Amitriptilina	15	Lidocaina	1,1
Pentazocina	7,1	Cimetidina	1,0
Bretilio	5,9	Cloramfenicolo	0,9
Verapamil	5,0	Desametasone	0,8
Propranololo	4,3	Nifedipina	0,8
Metoprololo	4,2	Neostigmina	0,7
Metadone	3,8	Eritromicina	0,7
Morfina	3,3	Caffeina	0,6
Nitroglicerina	3,3	Digitossina	0,5
Diltiazem	3,1	Fenobarbital	0,5
Minoxidil	3,1	Tubocurarina	0,4
Codeina	2,6	Kanamicina	0,3
Nicotina	2,6	Probenecid	0,2
Tiopentale	2,3	Acido valproico	0,2
Clonidina	2,1	Furosemide	0,1
Naloxone	2,1	Eparina	0,05

stesso. Altri farmaci possono accumularsi in organi specifici: ad esempio, l'antimalarico quinacrina è 1000 volte più concentrato nel fegato rispetto al plasma, mentre le tetracicline (una classe di antibiotici che tendono a legare ioni calcio) si accumulano nel tessuto osseo.

Come si può notare nella tabella 51.1, il volume apparente di distribuzione dei farmaci viene generalmente espresso in unità di volume per chilo di peso corporeo. In questo modo viene ridotta la variabilità tra individui di peso diverso; ovviamente, questa formulazione del V_d non tiene conto di altri fattori intuitivamente molto importanti quali la costituzione fisica, l'età e alcuni tipi di patologie. Inoltre, alcuni farmaci possono competere tra loro per i siti di legame negli organi deposito, determinando alterazioni reciproche nel V_d , fenomeno che è spesso da tenere in seria considerazione nel corso di terapie multifarmacologiche.

Per ogni farmaco, la costante k_p e il volume apparente di ogni compartimento (ottenuto dal prodotto: volume reale $\times k_p$) sono i parametri che, assieme al flusso ematico specifico e alle caratteristiche di permeabilità del letto capillare regionale, permettono di stimare sia la concentrazione d'equilibrio del farmaco nel tessuto che la velocità con cui tale concentrazione di equilibrio verrà raggiunta. In particolare, la concentrazione di equilibrio sarà k_p volte quella plasmatica e la velocità sarà data dal rapporto $\text{flusso}/[\text{volume apparente}] = \text{flusso}/[\text{volume} \cdot k_p] = [\text{flusso specifico}]/k_p$, se il farmaco diffonde agevolmente al tessuto. La velocità sarà più bassa se la diffusione è rallentata dalla difficoltà del farmaco a superare le membrane cellulari.

Il legame dei farmaci alle proteine plasmatiche

Nel sangue un farmaco può essere libero nell'acqua, legato a proteine plasmatiche o alle cellule circolanti. Per motivi inerenti le metodiche di analisi biochimiche utilizzate, nella maggior parte dei casi la concentrazione dei farmaci viene misurata sulla fase plasmatica. È però intuitivo che solo la quota di farmaco libero (non legato alle proteine plasmatiche) è in realtà in grado di uscire dal letto capillare e di mettersi in equilibrio nei volumi tissutali extravascolari. Potremmo quindi considerare il plasma come costituito da due compartimenti: la fase proteica che funge da organo di deposito circolante e la fase liquida, che è in equilibrio con tutti gli altri compartimenti tissutali (compresa la fase proteica del plasma stesso). Quindi conoscere la concentrazione plasmatica potrebbe non essere sufficiente per stimare con accuratezza la concentrazione tissutale del farmaco; come vedremo più avanti, la vera complicazione nasce dal fatto che la frazione libera del farmaco presente nel plasma può variare considerevolmente tra individui diversi e in corso di patologie e di terapie multifarmacologiche.

Quota libera e quota legata

È importante conoscere la quota di farmaco libero non solo per stimarne la reale concentrazione nell'organo bersaglio ma anche perché è la quota libera che entra efficacemente nella cellula epatica per venire metabolizzata o che viene filtrata a livello glomerulare e che determina perciò il tasso di eliminazione del farmaco.

Il grado di legame di un farmaco alle proteine plasmatiche è generalmente espresso dal rapporto (o dalla percentuale) tra la concentrazione di farmaco legato e la concentrazione totale del farmaco nel plasma; questo rapporto può teoricamente variare tra 0 e 1. Si dice che un farmaco è fortemente legato alle proteine plasmatiche quando il rapporto è superiore a 0,9 (90%), mentre per rapporti inferiori a 0,2 si dice che il farmaco è scarsamente o per nulla legato alle proteine plasmatiche.

La proteina plasmatica più importante per quanto riguarda la capacità di legare sostanze endogene ed esogene è l'albumina: essa costituisce circa il 50% delle proteine plasmatiche e presenta circa un centinaio di gruppi carichi, per lo più negativi, al pH fisiologico. Gli anioni organici sono le molecole legate principalmente dall'albumina: acidi grassi liberi, bilirubina, penicillina, sulfonamidi e salicilati, barbiturici e acido ascorbico (vitamina C); anche istamina, triiodotironina e tiroxina si legano all'albumina. Un'altra proteina importante per il trasporto di piccole molecole è l' α_1 glicoproteina acida, una α_1 -globulina che possiede un sito di legame ad alta affinità per molecole basiche.

Gli steroidi si legano alla proteina "transcortina", del gruppo delle α_1 -proteine; le proteine dei gruppi α_2 , β_1 e β_2 trasportano lipidi, colesterolo, vitamine liposolubili (A, K, D, E), emoglobina (trasportata dalla aptoglobina), ioni zinco, rame (legati alla ceruloplasmina) e ferro (legati alla transferrina).

Il legame dei farmaci alle proteine plasmatiche segue gli stessi principi che regolano le interazioni tra farmaco e recettore

Come nel caso del legame di un farmaco al recettore, il legame all'equilibrio è determinato dal rapporto tra le velocità di legame e di distacco (costante di dissociazione k , che esprime l'affinità del legame). L'equilibrio di una reazione chimica è raggiunto quando il rapporto reagenti/prodotti è uguale al rapporto tra le velocità di reazione nei due sensi. Quindi, indicando con $[B]$ la concentrazione di farmaco legato (*bound*), con $[F]$ la concentrazione di farmaco libero (*free*), con n il numero di siti di legame su ogni proteina, e con $[P]$ la concentrazione delle proteine, abbiamo una concentrazione di siti liberi data dalla differenza $n[P] - [B]$, e una situazione di equilibrio per:

$$\frac{(n[P] - [B]) \cdot [F]}{[B]} = k \quad \text{e} \quad \frac{[B]}{n[P]} = \frac{[F]}{(k + [F])}$$

La quantità di farmaco legata per mole di proteina è quindi:

$$\frac{[B]}{[P]} = \frac{n \cdot [F]}{(k + [F])}$$

che traccia la tipica curva che descrive le interazioni di legame tra farmaco e recettore, con ovviamente un legame massimo asintotico uguale a n quando la concentrazione libera $[F]$ è molto maggiore di k (vedi Capitolo 4).

La frazione di farmaco legato è espressa dalla seguente equazione:

$$\frac{[B]}{[B] + [F]} = \frac{n \cdot [P]}{k + n \cdot [P] + [F]}$$

Questa relazione ci fornisce diverse importanti informazioni.

1. La frazione legata (e viceversa la quota libera) dipende dalla concentrazione del farmaco, per cui qualunque affermazione del tipo "il tale farmaco è legato per oltre il 90% alle proteine plasmatiche" è incompleta in quanto ciò sarà vero solo per certe concentrazioni del farmaco; affermazioni di questo tipo sottintendono di regola "alle concentrazioni terapeutiche comunemente impiegate", ma è importante considerare che per concentrazioni più alte una frazione minore sarà legata (sale $[F]$ al denominatore) mentre per concentrazioni più basse la quota legata si avvicina al rapporto $n[P] / (k + n[P])$.
2. Per concentrazioni molto basse ($[F]$ trascurabile) la quota legata tende al limite $1 / (1 + k / (n[P]))$. In altre parole, per ogni farmaco la quota legata asintoticamente per basse concentrazioni del farmaco è determinata dal rapporto $k / (n[P])$ e quindi, considerando fissa la concentrazione di proteine plasmatiche $[P]$, solo dalla costante di dissociazione k e dal numero di siti di legame sulle proteine plasmatiche, n . Quanto più elevata è l'affinità (k bassa), tanto maggiore sarà la quota legata alle basse concentrazioni; in particolare per affinità molto alte (k molto bassa) il farmaco sarà praticamente tutto legato se presente nel plasma in basse concentrazioni.
3. Come è intuitivo, un aumento dei siti di legame ($n[P]$)

comporta un aumento della quota legata (si riduce il denominatore) e viceversa una riduzione (dovuta a riduzione dei livelli di proteine plasmatiche o a occupazione dei siti di legame da parte di altri farmaci più affini) comporta un aumento della quota libera.

4. In presenza di un legame massiccio con le proteine (ad esempio: ormoni tiroidei), la concentrazione del farmaco nel plasma in toto sarà più elevata di quella presente nei liquidi interstiziali ed eventualmente intracellulari. Ciò determina rilevanti conseguenze: a) la concentrazione plasmatica è più elevata di quella presente a livello recettoriale, e si può generare confusione nella definizione delle concentrazioni efficaci e tossiche del farmaco; b) il volume di distribuzione apparente sarà molto più basso del volume reale dei liquidi raggiunti dal farmaco; c) in presenza di concentrazioni libere terapeutiche, lo spiazzamento della quota legata da parte di altre sostanze endogene o esogene potrà determinare il raggiungimento di concentrazioni tossiche.

La concentrazione importante del farmaco è quella libera

Da quanto detto, appare chiaro che per determinare in modo più affidabile e significativo le concentrazioni terapeutiche di un farmaco, è più appropriato considerare la sua concentrazione libera nella fase acquosa del plasma; le concentrazioni misurate saranno più vicine a quelle "viste" dal recettore. È importante tenere a mente questo concetto soprattutto quando occorre modificare il dosaggio necessario per mantenere una certa concentrazione efficace nel corso di patologie croniche (soprattutto epatiche). In questo caso occorre fare riferimento alla concentrazione libera del farmaco, in quanto la concentrazione plasmatica totale può essere alterata o per variazioni della proteinemia totale o del profilo sieroproteico o per aumento di sostanze endogene capaci di interferire con il legame dei farmaci alle proteine plasmatiche.

È infine importante notare che quando il farmaco ha elevata affinità per le proteine plasmatiche, la frazione legata può essere molto elevata (anche sopra il 90 o il 95% per concentrazioni non troppo elevate del farmaco) e spesso la dissociazione del farmaco dalla proteina è lenta (è una regola di massima che alte affinità - basse k - comportino basse velocità di dissociazione). Le proteine plasmatiche possono perciò comportarsi come importante serbatoio di accumulo del farmaco con due importanti effetti: a) l'eliminazione renale può essere scarsa in quanto solo la quota libera può essere filtrata a livello glomerulare; b) la concentrazione plasmatica del farmaco libero decade molto lentamente.

Entrambi questi effetti implicano che, una volta sospesa la somministrazione del farmaco, esso potrà persistere in circolo a livelli plasmatici efficaci per giorni o anche per settimane.

Perché si fa sempre riferimento alla "concentrazione plasmatica"

Benché, come chiarito sopra, il parametro più significativo sia la concentrazione del farmaco libero nel plasma,

è in generale più semplice misurare, con le metodiche standard di laboratorio, la concentrazione plasmatica totale dei farmaci. Inoltre, la concentrazione plasmatica tiene conto della avidità del plasma, con il suo contenuto proteico, per il farmaco (per definizione la k_p del plasma è 1), e rende possibile l'impiego operativo del parametro V_d . Come vedremo, questo è molto utile per descrivere facilmente gli aspetti cinetici: da un lato permette la stima delle velocità di equilibrio dal semplice rapporto flusso/volume, dove il flusso è quello plasmatico e il volume è il V_d ; dall'altro permette di calcolare in modo estremamente agevole le dosi di farmaco da impiegare per ottenere la concentrazione plasmatica desiderata – e viceversa la concentrazione plasmatica che si otterrà con un determinato protocollo di somministrazione – sulla base della *clearance* del farmaco (vedi oltre).

Farmaci o sostanze endogene possono spiazzare altri farmaci dalle proteine plasmatiche e modificare la quota libera

Il legame di farmaci e/o sostanze endogene alle proteine plasmatiche è generalmente non selettivo; è quindi facile che tra le varie molecole possano avvenire fenomeni di competizione per il legame a uno stesso sito. Questa competizione può determinare spiazzamento e importanti variazioni dei livelli di farmaco libero e quindi dei suoi effetti. In realtà il problema assume un significato clinico solo quando il farmaco "spiazzato" ha un basso indice terapeutico, è fortemente legato alle proteine plasmatiche (indice superiore a 0,9) e ha un volume di distribuzione apparente piuttosto limitato; in queste condizioni il trasferimento del farmaco "liberato" dal sangue ai tessuti può comportare un significativo aumento della concentrazione del farmaco sul suo sito d'azione e l'insorgenza di effetti tossici.

Esempio tipico di farmaco il cui spiazzamento può avere conseguenze pericolose per il paziente è la warfarina, un anticoagulante orale, spesso usato nella terapia postinfartuale o dopo intervento cardiocirurgico. Questi pazienti possono andare incontro a gravi episodi emorragici se trattati con farmaci acidi, come salicilati, fenilbutazone e sulfamidici. Da notare che tutti e tre i farmaci riportati a titolo di esempio sono eliminati attraverso biotrasformazione epatica: poiché questa è direttamente dipendente dalla concentrazione di farmaco libero, si può prevedere che l'aumento della concentrazione di farmaco libero sarà transitorio in quanto buona parte del farmaco "liberato" sarà rapidamente eliminato dal fegato. Fa eccezione il caso dell'interazione warfarina-fenilbutazone in quanto quest'ultimo è anche capace di inibire il metabolismo epatico dell'anticoagulante. Gli stessi farmaci acidi sono in grado di spiazzare la tolbutamide, un ipoglicemizzante orale, e la fenitoina, un antiepilettico (per approfondimento vedi Capitolo 52).

Il fenomeno dello spiazzamento può interessare anche sostanze endogene, come nel caso dell'interazione bilirubina-sulfamidici, causa nel passato di pericolose complicazioni iatrogene dell'ittero post-natale. Nel neonato, che ha già di per sé ridotta capacità di coniugazione

della bilirubina al glicuronide, i livelli di bilirubina non coniugata e circolante legata all'albumina plasmatica si innalzano nei primi giorni di vita (ittero post-natale); a causa dello spiazzamento dalla proteina circolante da parte del sulfamidico, l'aumento della quota libera di bilirubina può portare a importanti depositi a livello dei gangli basali e nuclei subtalamicici, dando luogo alla encefalopatia tossica chiamata kernittero.

Fattori che influenzano la velocità di distribuzione di un farmaco nei vari compartimenti

La velocità di distribuzione di un farmaco tra il sangue circolante e il tessuto di un dato compartimento può essere limitata dalla perfusione e/o dalla permeabilità locali. I fattori di ostacolo alla diffusione sono gli stessi discussi al Capitolo 50 per l'assorbimento. Se il farmaco è sufficientemente lipofilo da attraversare rapidamente le membrane presenti nel tessuto e/o i capillari sono altamente permeabili come a livello muscolare, sottocutaneo e renale, il sangue, grazie al fatto che la sua velocità nei capillari è molto bassa, riesce a mettersi in equilibrio con l'interstizio prima di lasciare il circolo capillare. In questi casi la perfusione ematica diventa il fattore limitante la velocità della distribuzione sangue/tessuto.

La velocità di perfusione ematica varia tra i diversi organi (Tabella 51.2). Questo valore è espresso in ml/min per ml di tessuto – perfusione specifica – ovvero in min^{-1} (si noti che questa è già dimensionalmente una velocità, e rappresenta appunto il tasso – o costante di velocità – del processo di scambio sangue-tessuto); esso può variare in condizioni fisiologiche e patologiche che alterino il flusso ematico totale (gittata cardiaca) o determinino una ridistribuzione del flusso (attivazione ortosimpatica, alterazioni ateromatose ecc.). A parità di permeabilità, tessuti ben perfusi accumulano un farmaco molto più rapidamente di tessuti meno perfusi. Per questo motivo, la somministrazione endovenosa di tiopentale (un barbiturico utilizzato per indurre anestesia) produce il suo effetto massimo nel giro di pochi secondi (accumulo cerebrale rapidissimo); l'effetto decade poi lentamente in quanto il farmaco si ridistribuisce dal tessuto cerebrale altamente perfuso agli

TABELLA 51.2 Valori emodinamici di vari organi

Organo	% volume corporeo	Flusso plasmatico (ml/min)	% gittata cardiaca	Velocità di perfusione (ml/min per ml tessuto)
Polmoni	0,7	2500	100	5
Reni	0,4	650	22	2
Surrene	0,03	12	0,2	0,6
Fegato	2,3	650	27	0,4
Cuore	0,5	100	4	0,3
Cervello	2	350	14	0,25
Tessuto adiposo	10	100	4	0,01
Ossa	16	125	5	0,01
Muscolo (a riposo)	42	375	15	0,01

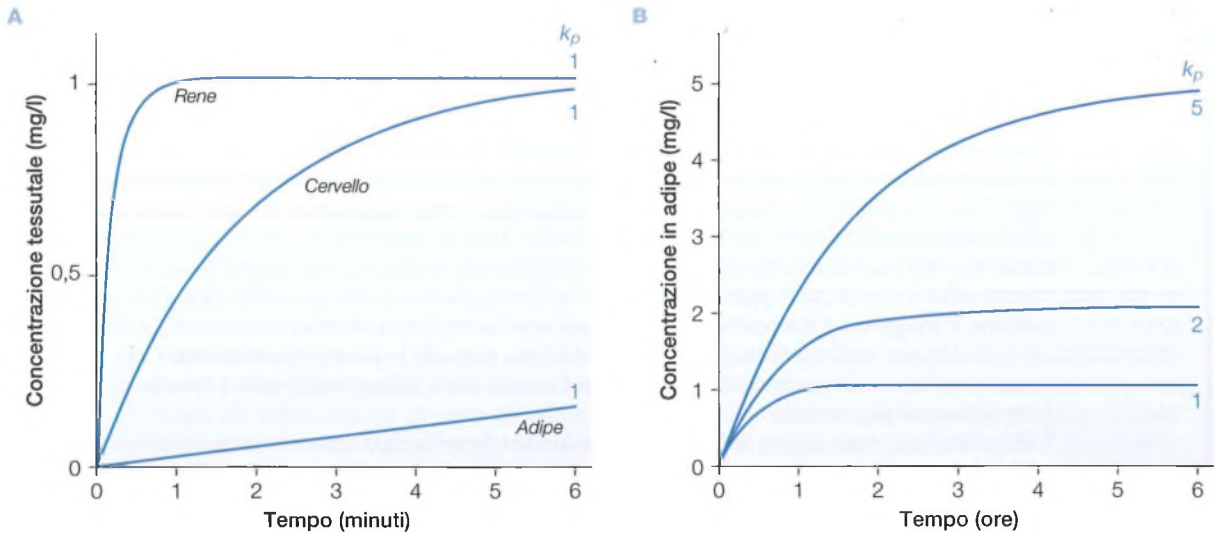


FIGURA 51.2 Distribuzione di farmaci nei diversi tessuti. **A.** A parità di avidità del tessuto per un farmaco (k_p è 1 in tutti i distretti), gli organi più perfusi si equilibrano più rapidamente con il plasma. Con il passare del tempo, anche la curva per il tessuto adiposo raggiungerà il valore di equilibrio di 1 mg/l osservato per cervello e rene. **B.** Andamento della concentrazione di farmaci diversi in uno stesso distretto (adipe); a parità di flusso, valori più alti di k_p determinano raggiungimento dell'equilibrio di distribuzione in tempi più lunghi e con livelli di concentrazione tissutale più alti.

altri tessuti ricchi di lipidi e dotati di maggiore massa ma minore velocità di perfusione (Box 2).

La distribuzione di un farmaco dal sangue a un tessuto segue generalmente una cinetica di I ordine.

La differenza di concentrazione tra plasma e tessuto si riduce nell'unità di tempo di una frazione costante, definita costante di velocità del processo di distribuzione al tessuto (k_T). La costante di velocità dipende dal flusso, dal volume del tessuto e dall'affinità del farmaco per il tessuto stesso. In una cinetica di I ordine l'intervallo di tempo necessario perché la differenza di concentrazione tra i due compartimenti si dimezzi è costante e viene definito emivita ($t_{1/2}$). Esso si calcola dalla formula seguente:

$$t_{1/2} = 0,693 / k_T = 0,693 \cdot k_p \cdot V_T / \Phi$$

dove k_p è il rapporto tra le concentrazioni del farmaco nel tessuto e nel sangue all'equilibrio (un indice della avidità del tessuto per il farmaco), V_T è il volume del tessuto, il prodotto $k_p \cdot V_T$ rappresenta il volume apparente di distribuzione del tessuto (vedi sopra), Φ è il flusso ematico, e il numero 0,693 è il logaritmo naturale di 2. La costante di velocità della distribuzione del farmaco dal sangue al tessuto o dal tessuto al sangue, k_T , risulta definita dal rapporto: [flusso] / [volume apparente] ovvero [flusso specifico] / [k_p].

Se la concentrazione arteriosa del farmaco viene mantenuta costante attraverso un'infusione continua, la concentrazione tissutale del farmaco continuerà a salire fino a raggiungere un equilibrio, per cui tanto farmaco entra nel tessuto e altrettanto ne esce; come nel caso delle cinetiche di eliminazione (vedi oltre), anche per l'accumulo il tempo necessario per il raggiungimento dell'equilibrio sangue-tessuto dipende dall'emivita del fenomeno.

Una semplice analisi delle formule precedenti dimostra che la rapidità con cui l'accumulo avviene dipende dal

flusso ematico e che maggiori sono il volume e l'avidità del tessuto per il farmaco, più lungo è il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio. Un'ovvia conseguenza di ciò è illustrata nella figura 51.2A: a parità di k_p , l'accumulo avviene più rapidamente in rene e cervello, organi molto perfusi, che nel tessuto adiposo. La figura 51.2B mostra invece come, in un dato tessuto, farmaci diversi con k_p crescenti raggiungano l'equilibrio più tardivamente e concentrazioni tissutali più elevate.

Poiché tutto quello che si è detto sul passaggio di farmaco dal sangue ai tessuti vale anche per il passaggio successivo dai tessuti al sangue, possiamo dedurre che anche il rilascio di farmaci dai tessuti avviene più lentamente se il tessuto è poco perfuso e/o se la sua capacità di accumulare il farmaco è maggiore.

Ricordiamo però che quanto detto sinora in questo paragrafo si riferisce a situazioni in cui il farmaco è libero di diffondere dal sangue al tessuto e viceversa; in tali condizioni il sangue che perfonde il tessuto riesce a equilibrarsi con esso (ovvero sangue venoso regionale e tessuto sono in equilibrio), data la grande superficie e la lentezza del circolo nel letto capillare. Come ampiamente descritto nel Capitolo 49, esistono zone del sistema circolatorio in cui la diffusione dei farmaci può essere limitata dall'organizzazione istologica del tessuto e dei vasi che lo irrora: le cosiddette barriere. In questo caso il fattore limitante della distribuzione non è solo la perfusione del tessuto ma anche la sua permeabilità nei confronti del farmaco. La velocità dei processi potrà essere pertanto più bassa, limitata dal fatto che il sangue venoso non riesce a equilibrarsi con il tessuto.

La figura 51.3 mostra come farmaci diversi si accumulino con velocità differente nel SNC: in questo caso le differenze di cinetica sono dovute al coefficiente di ripartizione lipidi/acqua e al grado di ionizzazione: maggiore il

BOX 2 Un modello idraulico per capire la farmacocinetica

Immaginiamo di trovarci di fronte a un sistema idraulico formato da una pompa che fa circolare dell'acqua in recipienti di varie dimensioni e collegati alla pompa mediante tubi di calibro diverso (vedi Figura). Se in questo sistema viene iniettato un colorante, esso tenderà a diffondersi fino a raggiungere la stessa concentrazione dappertutto. Prima di raggiungere questa situazione di equilibrio, però, il colorante avrà concentrazioni diverse nei vari serbatoi. Ogni serbatoio scambia nell'unità di tempo con il resto del circuito una quantità di acqua proporzionale al calibro del tubo che lo alimenta, e per equilibrarsi deve scambiare tutta l'acqua che contiene: si equilibrerà pertanto con una velocità proporzionale al rapporto tra il calibro del suo tubo (flusso che riceve) e il suo volume, rapporto definito come *flusso specifico* o *perfusione specifica*. Più piccolo è il serbatoio e più grosso è il tubo che lo alimenta, più rapidamente si equilibrerà con il circuito. La distribuzione di un farmaco nell'organismo segue principi del tutto analoghi: i serbatoi rappresentano i vari organi e tessuti – spesso indicati come *compartimenti* – e il circuito che li collega rappresenta il torrente circolatorio (compartimento plasmatico).

È importante osservare che nei serbatoi meglio perfusi l'andamento della concentrazione del colorante potrà addirittura essere bifasico, ovvero salire fino a livelli molto alti e poi scendere verso l'equilibrio finale; vi sarà infatti un momento (**A**, nella figura) nel quale il colorante è penetrato solo in piccola parte nei serbatoi poco perfusi (recipiente in basso) e si è invece sostanzialmente equilibrato con quelli meglio perfusi; di qui in poi, la concentrazione del colorante nel circuito (e di conseguenza anche nei serbatoi meglio perfusi) scenderà via via che il colorante lascia il circuito per equilibrarsi anche nei serbatoi meno perfusi (**B**, nella figura). Fenomeni di questo genere, a cui si fa riferimento con il termine *ridistribuzione*, sono molto importanti nell'organismo, specialmente per farmaci attivi sul sistema nervoso: essi possono raggiungere elevate concentrazioni nel cervello (organo ad altissima perfusione specifica) prima di distribuirsi significativamente ad altri tessuti. La loro azione farmacologica è di breve durata a causa della ridistribuzione a tutto l'organismo e non a causa della eliminazione.

Perché il modello idraulico sia più adeguato, dobbiamo ancora aggiungere due rubinetti: uno da cui far uscire con velocità costante una frazione del liquido circolante contenente il colorante, l'altro che immette un uguale volume di acqua pulita (**C**, nella figura). Questa aggiunta al nostro modello idraulico rappresenta gli organi emuntori (rene, fegato ecc.) e il volume di liquido colorato che nell'unità di tempo è sostituito con acqua pulita rappresenta la *clearance* del farmaco (ovvero volume di plasma "ripulito" dal farmaco nell'unità di tempo, vedi oltre). Il colorante esce con l'acqua dal rubinetto di scarico e la sua concentrazione nel sistema diminuisce gradualmente. Ancora una volta la velocità del processo (di eliminazione in questo caso) è determinata da un rapporto tra flusso e volume: in questo caso il flusso è la clearance (volume ricambiato nell'unità di tempo cioè flussi dei rubinetti) e il volume è quello totale del sistema. Regolando il rubinetto di eliminazione (ovvero alterando la clearance), la velocità di eliminazione risulterà alterata.

Poiché in realtà il torrente ematico non è in diretta continuità con i liquidi interstiziali dei tessuti, il nostro modello idraulico dovrebbe includere dei filtri che separino il circuito dai vari serbatoi (linee tratteggiate), e che rappresentino la diversa permeabilità dei distretti capillari nei vari compartimenti dell'organismo. È evidente che un filtro molto efficace può divenire il fattore limitante la velocità con cui un serbatoio molto perfuso si equilibra; per serbatoi poco perfusi la velocità di equilibrio sarà invece ancora limitata dal basso flusso specifico. Fenomeni di ridistribuzione con concentrazioni transitoriamente elevate a livello del SNC si verificheranno quindi solo con farmaci lipofili che attraversano agevolmente la barriera ematoencefalica. Farmaci

coefficiente e minore il grado di ionizzazione, più rapido sarà l'accumulo cerebrale del farmaco. Ovviamente sia l'emivita di distribuzione (di accumulo e di rilascio) che l'entità dell'accumulo sono dipendenti anche dall'affinità del tessuto per il farmaco. Da notare che l'affinità del tessuto nervoso per un farmaco non dipende esclusivamente dal grado di lipofilia di quest'ultimo.

Eliminazione

L'eliminazione di un farmaco avviene per escrezione e/o per biotrasformazione; le possibili tappe metaboliche a cui può andare incontro un farmaco e gli effetti del meta-

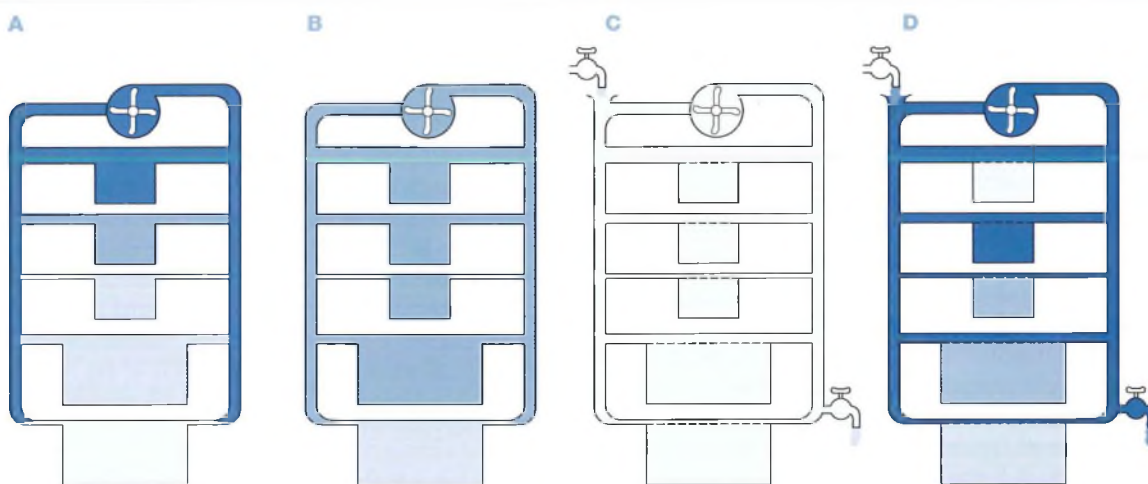
bolismo sull'attività del farmaco stesso sono descritti nel Capitolo 52. La principale via di escrezione delle sostanze endogene ed esogene dall'organismo è quella renale, ma diversi farmaci sono escreti in quota significativa a livello biliare; la possibilità di eliminazione di farmaci a livello polmonare (in particolare i gas anestetici) verrà discussa nel Capitolo 53.

In linea di massima, i processi che portano alla eliminazione della maggior parte dei farmaci seguono una cinetica di I ordine. Il significato di questo termine è illustrato nel Box 1 del Capitolo 50.

È però importante ricordare che la cinetica di eliminazione di alcuni farmaci può non essere esclusivamente di I ordine: questo avviene per quei farmaci, come la

meno lipofili, per i quali la barriera ematoencefalica agisce da filtro efficace, penetreranno più lentamente e non daranno picchi encefalici da ridistribuzione o non penetreranno affatto se sono decisamente idrofili o addirittura carichi (**D**, nella figura).

Una precisazione è indispensabile per l'interpretazione corretta di un semplice modello idraulico dell'organismo come quello qui illustrato. Nei capitoli precedenti si è parlato di tropismo dei farmaci per certi tessuti, di coefficiente di ripartizione (ovvero di tendenza ad accumularsi nei lipidi) e di trappole di pH (per farmaci con gruppi acidi/basici deboli che sono dissociati in diverso grado a pH diversi). Consideriamo un farmaco che tenda ad accumularsi in un particolare tessuto e supponiamo che l'equilibrio venga raggiunto quando la concentrazione nel tessuto è doppia rispetto a quella plasmatica. All'equilibrio, il tessuto in esame conterrà la quantità di farmaco che è contenuta in un volume di plasma doppio. Pertanto, il tessuto si comporterà, da un punto di vista cinetico, come se avesse volume doppio. Inversamente, in presenza di un farmaco che abbia tropismo per il plasma (ad esempio perché si lega in gran parte alle proteine plasmatiche), gli altri compartimenti potranno comportarsi come se avessero un volume inferiore a quello reale. Questo fenomeno ha dato luogo alla definizione del concetto di *volume apparente di distribuzione*, già discusso in dettaglio. È chiaro che nel nostro modello idraulico ogni serbatoio che rappresenti uno specifico compartimento dell'organismo dovrà avere un volume non uguale al volume reale del compartimento corrispondente, ma uguale al suo volume apparente di distribuzione. Quest'ultimo potrà essere diverso – anche molto – per farmaci differenti. Questo modello fa intuire una serie di principi generali che debbono essere tenuti in debito conto: la concentrazione di un farmaco nei vari distretti dell'organismo dipende da fattori molteplici quali: flusso distrettuale, caratteristiche fisico-chimiche del tessuto, differenze di permeabilità del letto capillare nei vari distretti, legame dei farmaci alle proteine plasmatiche. Il modello ci dice pure che *la velocità di eliminazione di un farmaco è semplicemente derivabile dal rapporto tra clearance e volume di distribuzione apparente nell'organismo*, e aiuta a intuire come l'insorgenza di patologie che modificano la costituzione fisica del paziente o le sue capacità di clearance possano alterare notevolmente l'andamento cinetico della concentrazione plasmatica e tissutale di un farmaco.



fenitoina e l'alcol, per i quali l'eliminazione si basa fondamentalmente su processi metabolici (o di escrezione attiva renale) saturabili. In questo caso in presenza di alte concentrazioni la cinetica di eliminazione è di ordine zero (una quantità fissa di farmaco metabolizzato nell'unità di tempo) e diviene di I ordine solo a concentrazioni più basse, non saturanti il sistema di biotrasformazione o di trasporto.

Concetto di emivita

Quando una cinetica di eliminazione è di I ordine, essa disegnerà una retta in un grafico in scala semilogaritmica (Figura 50.1 e fase di eliminazione di Figura 51.1). Dai

grafici si può facilmente ricavare che l'intervallo di tempo che separa due punti in cui il valore di concentrazione del secondo sia la metà del primo è sempre lo stesso e dipende unicamente dalla pendenza della retta. L'intervallo di tempo necessario perché la concentrazione plasmatica si dimezzi è quindi indipendente dal valore di concentrazione iniziale e viene detto emivita o $t_{1/2}$. Come già ampiamente descritto, l'equazione di base che governa questo tipo di cinetiche è la seguente:

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \text{ ovvero } C / C_0 = e^{-kt} \quad [1]$$

in cui C_0 è la concentrazione iniziale, C la concentrazione al tempo t e k è la costante di velocità del processo, cioè il valore frazionario (percentuale) di cui si riduce la concen-

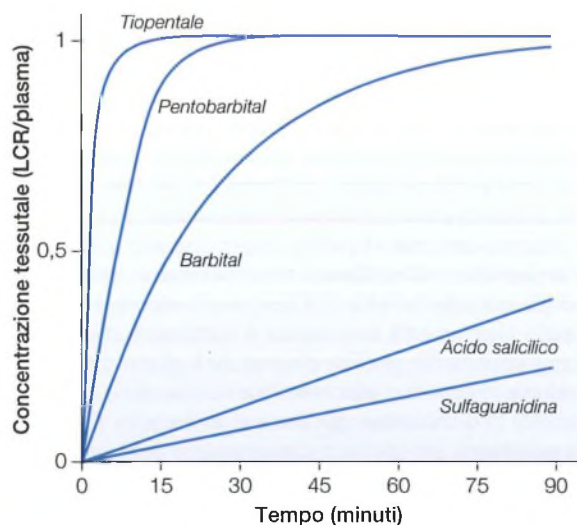


FIGURA 51.3 Differenze nella velocità con cui diversi farmaci si equilibrano con il liquido cefalorachidiano (e il SNC). Per questi farmaci, k_p è uguale a 1 e quindi la concentrazione all'equilibrio è pari a quella plasmatica; a determinare la diversa velocità non è pertanto un diverso valore di k_p ma la diversa capacità di superare la barriera ematoencefalica.

trazione del farmaco nell'unità di tempo. Per definizione, l'emivita è il tempo t necessario perché C/C_0 sia pari a 0,5; dalla formula [1] abbiamo quindi:

$$\log(0,5) = -0,693 = -k \cdot t_{1/2}; \text{ ovvero:} \quad [2]$$

$$t_{1/2} = 0,693 / k; \text{ ovvero } k = 0,693 / t_{1/2} \quad [3]$$

È quindi chiaro che il valore di emivita esprime l'efficienza dei processi di eliminazione dell'organismo nei confronti di un dato farmaco. Esso è indipendente dalla concentrazione del farmaco e unicamente dipendente dallo stato funzionale degli organi o sistemi del paziente preposti all'eliminazione del farmaco stesso.

Farmaci con emivita breve (e quindi con k elevata) saranno eliminati rapidamente; farmaci con emivita lunga permarranno a lungo all'interno dell'organismo. Ogni farmaco è caratterizzato da un suo proprio valore di emivita che può variare da pochi minuti a settimane. In linea di massima, quei farmaci che hanno un grosso volume di distribuzione (organo di deposito di grosse dimensioni e alta affinità) hanno anche un'emivita lunga, in quanto il farmaco che viene eliminato viene continuamente rimpiazzato da quello accumulatosi nei depositi.

Alterazioni patologiche degli organi di eliminazione porteranno a un aumento dell'emivita di un farmaco e quindi a un prolungamento dei suoi effetti (benefici o tossici). Difetti nei processi di eliminazione del farmaco determinano un aumento del valore massimo di concentrazione plasmatica conseguente alla somministrazione di una dose del farmaco. Come vedremo più avanti (vedi Capitolo 53), alterazioni dei valori di emivita richiedono correzioni del regime terapeutico a cui il paziente è sottoposto, soprattutto per quei farmaci in cui la finestra terapeutica della concentrazione plasmatica è ristretta.

Concetto di clearance

Abbiamo affermato che in generale la cinetica di eliminazione dei farmaci è di I ordine, ovvero che una frazione costante (k_e) della quantità presente nell'organismo viene persa nell'unità di tempo. Poiché, una volta che il farmaco si è distribuito ai tessuti, la quantità di farmaco presente nell'organismo è data dal prodotto $V_d \cdot C_p$ (volume apparente di distribuzione per concentrazione plasmatica), la quantità eliminata nell'unità di tempo (Q_e) sarà data dal prodotto $k_e \cdot V_d \cdot C_p$, ovvero sarà equivalente alla quantità di farmaco presente in un volume di plasma $k_e \cdot V_d$. È come se nell'unità di tempo $k_e \cdot V_d$ litri di plasma venissero "ripuliti" (cleared) del farmaco che contengono. Con il termine *clearance* (Cl) si intende appunto il volume di sangue virtualmente ripulito nell'unità di tempo dai processi di eliminazione; pertanto:

$$Cl = k_e \cdot V_d \quad [4]$$

e quantità eliminata nell'unità di tempo = clearance \times concentrazione plasmatica, ovvero:

$$Q_e = k_e \cdot V_d \cdot C_p = Cl \cdot C_p \quad [5]$$

L'unità di misura della clearance è volume per unità di tempo.

Poiché per ogni farmaco in ciascun paziente k_e è una costante (dipendente dall'efficienza dei processi biologici di eliminazione) e il volume di distribuzione è anch'esso una costante (dipendente dalla costituzione fisica del paziente), se ne deduce che anche la clearance ha un valore costante indipendente dalla concentrazione plasmatica del farmaco (NB. Questo vale fintanto che le cinetiche di eliminazione sono di I ordine; in presenza di cinetiche di ordine zero la clearance dipende invece dalla concentrazione, in quanto una quantità fissa eliminata nell'unità di tempo corrisponde a un volume di plasma tanto minore quanto più alta è la concentrazione plasmatica).

Infine, combinando le equazioni [3] e [4], possiamo mettere in relazione tra loro emivita, clearance e volume di distribuzione di un farmaco:

$$t_{1/2} = 0,693 / k_e = 0,693 \cdot V_d / Cl \quad [6]$$

Si noti infine che la clearance permette di stimare correttamente il volume apparente di distribuzione (V_d) con un metodo alternativo all'estrapolazione a zero della curva di concentrazione plasmatica. Misurata la concentrazione del farmaco nel plasma e la quantità eliminata in un certo intervallo di tempo t , la clearance si calcola – secondo l'equazione [5] – dal rapporto [quantità eliminata nell'unità di tempo]/[concentrazione plasmatica]; la $t_{1/2}$ si deriva facilmente dalla curva di concentrazione plasmatica. Riaggiustando l'equazione [6], il V_d si calcola come:

$$V_d = t_{1/2} \cdot Cl / 0,693 \quad [7]$$

Clearance totale e clearance d'organo

Abbiamo visto fino ad adesso la clearance come quel fattore che mette in relazione la quantità di farmaco eliminata nell'unità di tempo con la sua concentrazione plasmatica ($Q_e = Cl \cdot C_p$). La clearance può essere vista an-

che sotto un aspetto "d'organo", cioè in funzione dell'eliminazione di farmaco prodotta da un organo specifico. Quest'ultimo approccio presenta il grosso vantaggio di poter fare delle considerazioni sugli effetti che alterazioni funzionali dell'organo, variazioni del legame del farmaco alle proteine, alterazioni di attività enzimatiche o di processi secretivi avranno sulla clearance "totale" del farmaco; come si vedrà nel Capitolo 53, queste considerazioni saranno utili per adattare il regime terapeutico alle condizioni fisiopatologiche di ciascun paziente.

La clearance totale può essere vista come la somma delle clearance di ciascun organo; in termini pratici, nella maggior parte dei casi si parla di clearance renale (Cl_r) e di clearance non-renale (Cl_{nr}). In realtà, la maggior parte delle tavole farmacocinetiche dei farmaci riportano i valori di clearance totale; tuttavia è possibile stimare la clearance renale (o epatica) di un farmaco conoscendone la percentuale eliminata con le urine (o eliminata dal fegato). La velocità di estrazione di un farmaco durante il passaggio attraverso un organo è data dal prodotto del flusso plasmatico (Φ) per la differenza tra le concentrazioni arteriosa e venosa ($C_A - C_V$); se la velocità di estrazione è normalizzata per la velocità di presentazione ($\Phi \cdot C_A$), si ottiene l'indice di estrazione:

$$\text{Indice di estrazione} = (C_A - C_V) / C_A \quad [8]$$

Se invece la velocità di estrazione è messa in relazione con la concentrazione d'ingresso (arteriosa), si ottiene, per definizione, il valore di clearance d'organo:

$$\begin{aligned} \text{Clearance d'organo} &= \Phi \cdot (C_A - C_V) / C_A = \\ &= \Phi [\text{indice di estrazione}] \quad [9] \end{aligned}$$

ovvero la clearance di un organo è uguale al prodotto del flusso plasmatico per l'indice di estrazione dell'organo stesso.

Così come il valore dell'indice di estrazione non può, per definizione, variare che da 0 a 1, così la clearance non può essere superiore al flusso plasmatico dell'organo ripulente. In altre parole la clearance massima teorica di un organo è data dal suo flusso plasmatico; nel caso del rene e del fegato questo valore è di 650 e 800 ml/min rispettivamente.

Escrezione renale dei farmaci

Il principio di funzionamento del rene è la filtrazione poco selettiva di grossi volumi di liquido plasmatico seguita dal riassorbimento più selettivo di circa il 99% dell'acqua filtrata e di parte dei relativi soluti e dalla secrezione attiva tubulare di acidi e basi dal plasma al lume tubulare. Il rene riceve un importante flusso ematico (circa 1,3 litri/min, corrispondente a circa il 25% della gittata cardiaca). Circa il 20% della componente acquosa (flusso plasmatico \approx 650 ml/min) viene filtrato a livello glomerulare, determinando un tasso di filtrazione glomerulare che si aggira sui 130 ml/min (più di 150 litri al giorno). I capillari glomerulari sono caratterizzati da una permeabilità particolarmente elevata, e con l'acqua plasmatica sono

filtrate a livello glomerulare sostanze con peso molecolare fino a diverse migliaia di dalton. Vengono trattenute le proteine plasmatiche, e di conseguenza la quota dei composti e farmaci a esse legata.

Nel percorso lungo il nefrone, processi attivi di riassorbimento di ioni determinano il riassorbimento del 99% dell'acqua filtrata; contemporaneamente tutti i farmaci sufficientemente lipofili e in grado di attraversare per diffusione passiva le membrane delle cellule tubulari sono riassorbiti passivamente dalla preurina e ritornano in circolo. I composti con caratteristiche di idrofilia intermedia vengono parzialmente riassorbiti in funzione del loro grado di ionizzazione e del coefficiente di ripartizione della quota non ionizzata; le molecole cariche o con basso coefficiente di ripartizione, che non sono in grado di attraversare le membrane cellulari tubulari, sono escluse. La figura 51.4 mostra i possibili destini dei farmaci nel loro passaggio attraverso il nefrone: notare come solo la quota libera di farmaco sia filtrata a livello glomerulare e come solo i farmaci in grado di attraversare le membrane plasmatiche siano riassorbiti in modo significativo a livello tubulare. Processi di trasporto attivi determinano inoltre la secrezione o il riassorbimento di composti organici a livello tubulare, cosicché alcuni composti possono venire completamente riassorbiti (ad esempio: glucosio) e altri secreti così efficacemente da "ripulire" tutto il plasma che percola nel parenchima renale. In quest'ultimo caso in genere anche la quota di farmaco legata alle proteine plasmatiche fa in tempo, nel circolo capillare, a equilibrarsi via via con la fase liquida fino a essere anch'essa significativamente (e in alcuni casi completamente) secreta ed eliminata.

Filtrazione glomerulare

Come già accennato, il tasso di filtrazione glomerulare è di circa 130 ml/min. Un farmaco che non venga riassorbito né secreto a livello tubulare, e non legato alle proteine plasmatiche, avrà pertanto una clearance renale di 130 ml/min. In assenza di riassorbimento tubulare, ovvero se tutto il farmaco filtrato a livello glomerulare raggiungesse i dotti collettori e venisse eliminato con l'urina, ogni minuto una frazione $[0,130 \text{ litri} / V_d]$ della quota libera, q_l , del farmaco verrebbe eliminata, il che comporta una costante di velocità di eliminazione renale $k_c = q_l \cdot 0,13 / V_d$. Può essere utile considerare i farmaci non legati alle proteine plasmatiche, per i quali $q_l = 1$, e per nulla riassorbiti (ad esempio, farmaci molto idrosolubili e carichi elettricamente come alcuni curari): poiché essi non passeranno le membrane cellulari, potranno distribuirsi solo nel plasma e negli spazi interstiziali (circa 14 litri in un soggetto di 70 kg), e presenteranno perciò $k_c = 0,13 / 14 = 0,0093$, il che corrisponde a una costante di tempo di eliminazione $1/k_c = 108 \text{ min}$ e a una emivita di $0,693 / k_c = 75 \text{ minuti}$, ovvero poco più di un'ora. Questo valore è da ricordare come tipico per l'emivita di farmaci molto idrofili soggetti a eliminazione renale passiva (ovvero non soggetti a secrezione attiva a livello tubulare).

Il carboidrato polimerico inulina, che viene filtrato a livello glomerulare e non viene riassorbito né secreto a

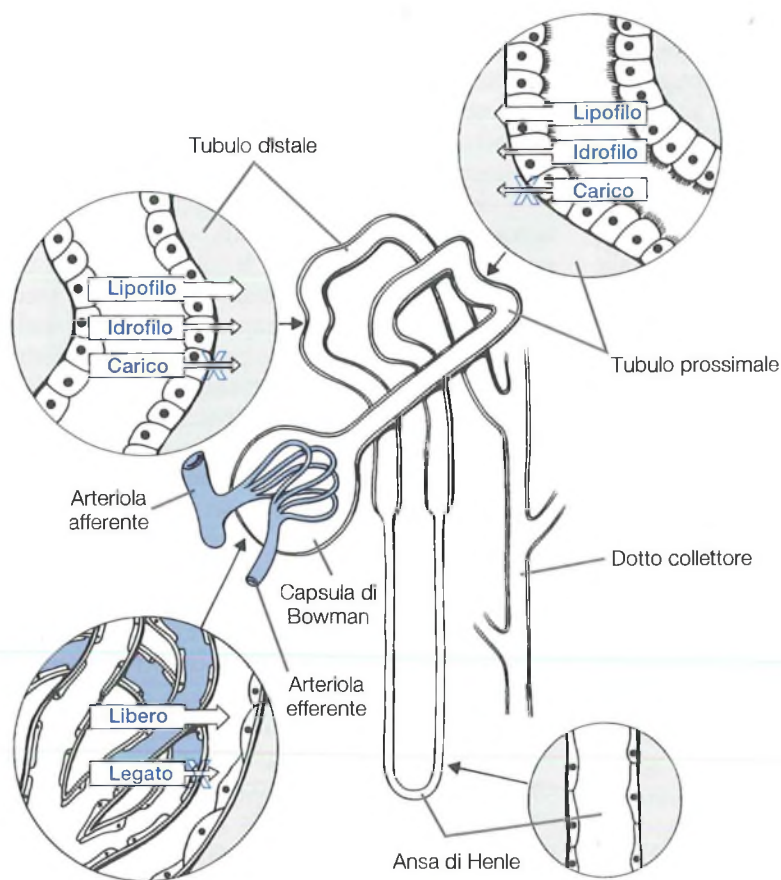


FIGURA 51.4 Rappresentazione schematica dei movimenti dei farmaci nel percorso lungo il nefrone.

livello tubulare, può essere impiegato sulla base di quanto appena detto proprio per stimare il tasso di filtrazione glomerulare. La sua emivita, con un V_d di circa 14 litri, è di 75 min; poiché, dalle equazioni [6] e [7], risulta che $Cl = 0,693 \cdot V_d / t_{1/2}$, la clearance dell'inulina si può calcolare uguale a $0,693 \cdot 14 / 75 = 129$ ml/min. Ogni minuto, cioè, circa 130 ml di plasma vengono "ripuliti" del loro contenuto di inulina. Poiché viene eliminata tutta e solo l'inulina filtrata a livello glomerulare, la quantità di plasma ripulita ogni minuto non è altro che il volume filtrato dal glomerulo ogni minuto: questo porta a stimare il tasso di filtrazione glomerulare attorno a 130 ml/min.

Riassorbimento passivo tubulare

Il percorso tubulare del nefrone, illustrato nella figura 51.4, può essere distinto in tre importanti sezioni: tubulo contorto prossimale, ansa di Henle e tubulo contorto distale. L'epitelio del tubulo contorto prossimale svolge due importantissime funzioni fisiologiche di cruciale importanza pure per la farmacologia: a) il riassorbimento massivo di una imponente quantità di filtrato glomerulare; b) il mantenimento della riserva alcalina dell'organismo. La superficie luminale dell'epitelio del tubulo contorto prossimale è caratterizzata da una ricchissima dotazione di microvilli, che costituiscono l'*orletto a spazzola*, come è stato definito per il suo aspetto a livello microscopico; come nell'epitelio intestinale, i microvilli aumentano enormemente la superficie di scambio.

A questo livello operano sistemi di trasporto che riassorbono il glucosio e gli amminoacidi (in modo virtualmente completo) fosfati e altre molecole, tra le quali, come si vedrà meglio più avanti, acidi organici e basi organiche; sono anche presenti meccanismi di secrezione attiva di molecole organiche. Questo processi possono essere rilevanti per il riassorbimento attivo di farmaci (che ne prolungherà l'emivita) o per la secrezione (che la ridurrà), e in alcuni casi possono avere rilevanza per l'azione dei farmaci stessi, come nel caso di diuretici attivamente secreti nel lume che raggiungono così direttamente il loro bersaglio, ovvero i sistemi di trasporto della membrana apicale delle cellule tubulari, esposti nel lume.

Sia il massivo riassorbimento di acqua e soluti che il mantenimento della riserva alcalina sono principalmente fondati sullo scambio di ioni sodio (Na^+) per protoni (H^+). Questo processo può procedere quasi indefinitamente (fino al riassorbimento completo del bicarbonato filtrato) grazie alla attività dell'enzima *anidraasi carbonica*, presente sia nella cellula epiteliale sia associata all'*orletto a spazzola*, nel lume. L'anidraasi carbonica permette la rapida trasformazione dell'acido carbonico, prodotto nel lume dalla combinazione bicarbonato + protone, in acqua e CO_2 ; quest'ultima penetra agevolmente nella cellula tubulare, dove ancora l'anidraasi carbonica ne facilita la combinazione con acqua dando luogo ad acido carbonico (H_2CO_3), il quale rapidamente si dissocia in ione bicarbonato e protoni. Vengono così continuamente prodotti protoni

da secernere, per continuare il ciclo riassorbendo bicarbonato, mentre bicarbonato e sodio vengono rilasciati nell'interstizio. Buona parte dei protoni che tenderebbero ad accumularsi nel lume tubulare si combinano a fosfato e acidi deboli, che agendo da tampone fanno sì che grosse quantità di protoni possano essere secreti prima che il pH urinario scenda significativamente. Lo stesso ruolo è svolto in modo ancor più efficiente dall'ammoniaca che, sintetizzata nel rene, diffonde al lume tubulare e lega protoni nell'ambiente acido tubulare generando ammonio quaternario, che resta intrappolato nel lume in quanto carico. Finché nel lume sono presenti sodio, che può essere scambiato con protoni, e bicarbonato, che con i protoni si combina e rigenera CO_2 , che diffonde liberamente dal lume alla cellula epiteliale, il processo può continuare, determinando un riassorbimento massivo di acqua (che segue il sodio) e di bicarbonato (mantenimento della riserva alcalina). Questo spiega come mai i primi farmaci ad azione diuretica entrati nell'uso clinico fossero intossicatori enzimatici non molto specifici (diuretici mercuriali) o farmaci capaci di inibire l'anidrasi carbonica. Un altro aspetto di grande rilevanza per la farmacologia sta nei notevoli volumi di acqua riassorbiti a questo livello (circa il 90% del filtrato glomerulare, come già accennato). I farmaci filtrati a livello glomerulare vengono a trovarsi concentrati nel tubulo prossimale, a causa del massivo riassorbimento d'acqua e, se sono sufficientemente lipofili, si ridistribuiranno seguendo l'acqua in modo tale che solo il 10% della quantità di farmaco filtrata proseguirà nel percorso tubulare.

Nell'ansa di Henle i trasporti ionici sono molto attivi, ma poiché l'epitelio è scarsamente permeabile all'acqua non si verifica un importante riassorbimento di acqua e farmaci a questo livello. Va però ricordato che l'estruzione attiva di elettroliti nell'ansa di Henle è il principale meccanismo di costituzione del gradiente osmotico presente nella midollare renale, ovvero il principale meccanismo responsabile della concentrazione dell'urina nel suo passaggio finale attraverso i tubuli e i dotti collettori. Il gradiente osmotico rende possibile il riassorbimento di ancora circa il 90% dell'acqua che ha superato il tubulo contorto prossimale (portando il riassorbimento totale a circa il 99% del filtrato glomerulare). Questo aspetto ha rilevanza, in farmacologia, sia perché il riassorbimento passivo di farmaci lipofili segue di pari passo il riassorbimento dell'acqua, sia perché una interferenza farmacologica con i meccanismi di trasporto dell'ansa può aumentare in modo drammatico i volumi di urina prodotta: questo effetto si ottiene con i cosiddetti diuretici dell'ansa come la furosemide.

L'epitelio del tubulo contorto distale è responsabile di un ulteriore intenso riassorbimento di sodio, che genera ulteriore tendenza dell'acqua a venire riassorbita. Il riassorbimento di farmaci che possono agevolmente passare le membrane si completa infine nel passaggio attraverso i tubuli e dotti collettori, che lasciano nell'interstizio iperosmotico della midollare buona parte dell'acqua che contengono. Questo riassorbimento finale è regolato

dall'ormone antidiuretico che rende l'epitelio dei dotti collettori permeabile all'acqua.

Un farmaco che passa molto agevolmente le membrane cellulari sarà sempre in equilibrio, nella preurina, con la concentrazione nell'interstizio circostante e avrà pertanto concentrazione uguale alla fase acquosa del plasma.

Poiché quest'ultima è data dal prodotto (concentrazione plasmatica) \times (quota libera), la clearance del farmaco sarà equivalente al volume dell'urina prodotta moltiplicato per la quota libera. Per i farmaci molto legati alle proteine plasmatiche, la clearance renale potrà essere trascurabile. Per i farmaci che hanno un grado di lipofilia (coefficiente di ripartizione) intermedio, la clearance sarà compresa tra i 130 ml/min dell'inulina e i valori trascurabili di farmaci molto lipofili. Vanno senz'altro richiamati a questo proposito i concetti espressi nel Capitolo 49 sull'influenza che il pH esercita sul coefficiente di ripartizione di basi e acidi deboli. Il pH urinario è di regola qualche unità più basso del plasma; ne consegue che i composti con pK_a superiore a 5 vengono in grande misura riassorbiti se la forma acida è quella non ionizzata, mentre vengono eliminati in misura rilevante se è la forma basica quella non ionizzata. La somministrazione di bicarbonato, alcalinizzando le urine, favorirà l'eliminazione di farmaci acidi (che tenderanno maggiormente a dissociarsi) e ridurrà invece l'escrezione di farmaci basici. Sfruttando questi principi è possibile, ad esempio, accelerare l'eliminazione e ridurre la durata degli effetti di farmaci acidi come i barbiturici assunti in dose tossica (ad esempio, a scopo suicida). Viceversa l'acidificazione delle urine sarà uno degli strumenti terapeutici da attuare in caso di intossicazione da composti basici, come le amfetamine.

Secrezione e riassorbimento attivi a livello tubulare

Glucosio, amminoacidi e altri composti essenziali sono riassorbiti attivamente a livello tubulare da sistemi di trasporto altamente specifici. Pertanto non compaiono mai nelle urine a meno che vengano filtrati in quantità tale da saturare la capacità di trasporto del sistema di riassorbimento. Il passaggio ("diabete", dal greco) di quantità significative di glucosio nell'urina si verifica ad esempio quando le concentrazioni plasmatiche si mantengono superiori ai livelli normali a seguito di carenza insulinica, eccesso di glucocorticoidi o altre alterazioni metaboliche. Due meccanismi di trasporto separati sono responsabili della secrezione attiva di composti endogeni e farmaci a livello tubulare; i due sistemi distinguono gli anioni dai cationi e sono entrambi localizzati nel tubulo prossimale.

Il sistema di trasporto degli anioni organici

Oltre a composti carbossilati e altri acidi dissociati, il sistema di trasporto degli anioni organici è attivo anche su composti con carica solo parziale come i sulfoni e le sulfonamidi. L'estrema varietà dei substrati, in termini di struttura molecolare e disposizione sterica dei gruppi carichi, suggerisce che il sistema sia notevolmente specifico; in realtà, è oggi chiaro che esso è costituito da un

certo numero di sottosistemi di trasporto a specificità differente. In generale, il sistema di trasporto responsabile della secrezione tubulare degli anioni è saturabile, e i vari anioni competono per esso. Il para-amminoippurato (PAI) è il composto classicamente impiegato per studiare questi sistemi di trasporto. A concentrazioni tali da non saturare il trasporto tubulare, il PAI che raggiunge il parenchima renale viene escreto in modo virtualmente completo, e mostra pertanto una clearance renale pari al flusso plasmatico renale (650 ml/min).

La funzione fisiologica del sistema di trasporto degli anioni consiste presumibilmente nella escrezione dei composti organici e metaboliti che sono stati coniugati con glicina, solfato o acido glicuronic. Attraverso questa via vengono attivamente escreti a livello tubulare antinfiammatori come i salicilati e il fenilbutazone, antibiotici come penicillina e cefalosporine, e diuretici come la furosemide, l'acido etacrinico e i tiazidici. È interessante notare che questi ultimi farmaci raggiungono meglio il loro sito d'azione una volta penetrati nel lume tubulare; infatti, interferendo con l'escrezione tubulare di questi diuretici se ne riduce l'efficacia.

È possibile sfruttare la competizione dei vari anioni per il sistema di secrezione tubulare allo scopo di interferire con la secrezione di un farmaco e prolungarne la permanenza nell'organismo. Ad esempio, somministrando l'acido organico probenecid si può ridurre la secrezione tubulare di penicillina permettendo di mantenere più a lungo concentrazioni plasmatiche efficaci dell'antibiotico.

I cationi organici vengono secreti attivamente attraverso un proprio sistema di trasporto

Anche questo sistema di trasporto è saturabile. I vari cationi competono tra loro per la secrezione ma non con gli anioni. I composti endogeni eliminati per questa via includono i neurotrasmettitori amminici (acetilcolina, dopamina, istamina, serotonina) e metaboliti come la creatinina. Benché possano avere strutture chimiche diverse, i substrati di questo sistema di trasporto debbono presentare un gruppo amminico, carico positivamente al pH fisiologico. Il sistema di trasporto è importante per l'eliminazione di alcaloidi naturali e loro derivati di interesse farmacologico (il bloccante muscarinico atropina e l'anticolinesterasico neostigmina), oltre che per composti cationici di sintesi (isoproterenolo ed esametonio) e per gli analgesici oppiacei (morfina e meperidina). È interessante osservare che un farmaco e i suoi metaboliti possono venire escreti attivamente per due diverse vie: ad esempio, la

morfina, una volta coniugata all'acido glicuronic a livello epatico, verrà escreta, anziché dal sistema di trasporto dei cationi, da quello degli anioni organici.

Gli anioni vengono riassorbiti attivamente a livello tubulare

Un meccanismo analogo a quello responsabile della secrezione attiva degli anioni opera a livello tubulare un riassorbimento molto efficiente di composti anionici. Il sistema di riassorbimento degli anioni è più specifico del sistema di secrezione tubulare, e di conseguenza la maggior parte dei composti anionici attivamente secreti passa nelle urine mentre i substrati del sistema di riassorbimento attivo degli anioni, anche se secreti in quantità significativa a livello del tubulo prossimale, saranno in larga misura riassorbiti. È questo il caso, ad esempio, dell'acido urico, attivamente secreto e attivamente riassorbito a livello tubulare. Anche il già citato probenecid è un buon substrato per il sistema di riassorbimento dei composti anionici; può quindi venire impiegato, nell'iperuricemia e nella gotta, per competere con l'acido urico inibendone il riassorbimento tubulare e incrementandone così l'eliminazione.

Fattori che determinano la clearance renale di un farmaco

Numerosi sono i fattori che influenzano i valori di clearance renale di un farmaco. Favoriscono l'eliminazione renale: l'assenza di legame alle proteine plasmatiche, l'elevata idrofilia, il grado di ionizzazione e la presenza di sistemi di trasporto attivo a livello tubulare. La tabella 51.3 riporta i valori tipici di emivita per farmaci filtrati e non riassorbiti, riassorbiti parzialmente o secreti attivamente. L'emivita dipenderà dal volume apparente di distribuzione del farmaco e dalla clearance. Nel caso di un farmaco che sia filtrato, non possa passare le membrane e non sia riassorbito o escreto, troveremo nelle urine la quantità presente nei 130 ml/min di filtrato glomerulare; 130 ml sono pertanto il volume di sangue "ripulito" dal rene in un minuto (*clearance renale*). Questo valore si ottiene per l'inulina. In casi di riassorbimento, la clearance sarà più bassa, fino al limite di zero per un totale riassorbimento tubulare. L'escrezione attiva può invece portare la clearance sopra i 130 ml/min fino a 650 ml/min (flusso renale) per una secrezione totale, come si osserva con il para-ammino-ippurato (PAI).

Alterazioni del flusso renale o glomerulare, patologie che limitano la permeabilità glomerulare o la funzionalità tubulare determinano una riduzione della clearance renale

TABELLA 51.3 Emivita di farmaci in funzione di clearance e volume di distribuzione

Clearance	Farmaco distribuito in		
	Acqua plasmatica 3 litri	Liquidi extracellulari 12 litri	Acqua corporea 41 litri
650 ml/min (secrezione tubulare)	$t_{1/2} = 3$ min	$t_{1/2} = 13$ min	$t_{1/2} = 44$ min
130 ml/min (filtrazione glomerulare)	$t_{1/2} = 16$ min	$t_{1/2} = 64$ min	$t_{1/2} = 219$ min
30 ml/min* (riassorbimento parziale)	$t_{1/2} = 65$ min	$t_{1/2} = 277$ min	$t_{1/2} = 947$ min

*L'esempio fornito per il riassorbimento parziale è arbitrario: la clearance può assumere qualunque valore tra 0 (riassorbimento completo) e 130 ml/min (o anche superiore se coesiste secrezione attiva tubulare)

TABELLA 51.4 Indici di estrazione renale ed epatica di farmaci

	Basso <0,3	Intermedio 0,3-0,7	Alto >0,7
Indice d'estrazione epatica*	Cabamazepina Diazepam Indometacina Fenobarbital Teofillina Warfarina Acido valproico	Aspirina Chinidina Codeina Nortriptilina	Alprenololo Desimipramina Isoproterenolo Lidocaina Morfina Nitroglicerina Propranololo Pentazocina
Indice d'estrazione renale*	Atenololo Digossina Furosemide Gentamicina Litio Tetracicline	Cimetidina Procainamide Cefalotina Penicilline (alcune)	Penicilline (alcune) Glucuronidi (alcuni)

*Fegato o rene sono ciascuno responsabili di almeno il 30% dell'eliminazione di ogni farmaco elencato

dei farmaci. Gli effetti saranno ovviamente più marcati per quei farmaci il cui indice d'estrazione renale è elevato. Un elenco parziale di farmaci con i relativi indici di estrazione renale è riportato nella tabella 51.4.

È pratica comune stimare la presumibile clearance renale di un farmaco sulla base della clearance della creatinina, che costituisce un buon indice complessivo della funzionalità renale e che si può stimare indirettamente con equazioni o tabulazioni sulla base della concentrazione plasmatica della creatinina. Aumenti della creatinemia rispetto ai valori normali indicano ridotta funzionalità renale e lasciano presumere una ridotta clearance per farmaci eliminati prevalentemente a questo livello, con conseguente allungamento delle emivite (vedi anche Capitolo 53).

I valori di clearance renale risultano particolarmente alterati nel neonato, e specialmente dal prematuro. In questi casi infatti i sistemi di trasporto tubulari non sono sviluppati in modo completo e risultano inefficienti. Le clearance renali dei farmaci risultano conseguentemente ridotte anche significativamente. Al tempo stesso la percentuale di acqua sul peso corporeo è di regola più alta nell'infante, e l'emivita dei farmaci può risultare prolungata anche di tre/quattro volte. Anche nel bambino le relazioni tra peso e volume di distribuzione, e tra peso e clearance renale, non sono sovrapponibili a quelle presenti nell'adulto e, di conseguenza, le emivite di eliminazione renale non sono coincidenti (vedi Capitolo 53).

Escrezione epatica e circolo entero-epatico

Il fegato svolge due diverse importanti funzioni sui farmaci presenti nell'organismo: metabolismo ed escrezione. I due processi sono strettamente legati in quanto un importante processo metabolico operato dagli epatociti consiste nella coniugazione di farmaci (e composti chimici in generale) con gruppi polari, processo che accrescendo il peso molecolare e la polarità dei composti li rende più suscettibili alla escrezione attiva nella bile.

Il circolo epatico è particolarmente adatto per favorire

l'eliminazione di composti dalla circolazione sistemica, in quanto questi, in arrivo sia dall'arteria epatica che dalla vena porta, fluiscono nei seni epatici che sono rivestiti da endotelio discontinuo, poroso e fenestrato, ricco di cellule fagocitarie di Kupffer e privo di membrana basale. Persino composti legati all'albumina riescono così a penetrare nello spazio di Disse presentandosi sulla superficie dell'epatocita.

Farmaci incapaci di passare la membrana cellulare qui possono venire trasportati molto efficientemente nella cellula epatica dai sistemi di trasporto utilizzati pure da sostanze endogene quali bilirubina e acidi biliari. Nella cellula, proteine trasportatrici quali le ligandine e le proteine Z possono contribuire a consegnare il farmaco al reticolo endoplasmatico, dove ha luogo il metabolismo o la coniugazione (vedi Capitolo 52); la ligandina appare possedere anche attività glutatione-S-trasferasica ed essere pertanto in grado di coniugare i substrati attivati. L'escrezione dei farmaci nella bile è influenzata principalmente da due caratteristiche fisiche: la polarità e il peso molecolare. La presenza di un gruppo polare, sia esso intrinseco alla molecola o presente nel gruppo con cui essa è coniugata, aumenta l'escrezione; l'epatocita è in grado di coniugare molti farmaci con acido glicuronico, glicina, glutatione, o gruppi solfato. In genere il processo aggiunge un gruppo anionico polarizzato a pH fisiologico, che aumenta l'escrezione da parte di un sistema di trasporto di anioni. La coniugazione aumenta anche il peso molecolare del composto; anche questo aspetto può essere importante ai fini dell'escrezione, perché solo composti con peso molecolare superiore a 300-500 vengono attivamente escreti nella bile.

Nella secrezione biliare sono coinvolti almeno quattro distinti sistemi di trasporto attivo, specifici, rispettivamente, per anioni, acidi biliari, cationi e sostanze neutre. Questo è dimostrato dal riscontro di rapporti di concentrazione bile/plasma anche superiori a 50:1, dalla saturabilità del trasporto, e dalla competizione per l'escrezione tra diversi substrati della stessa classe ma non di classi differenti. Tra gli acidi organici escreti attivamente nella bile ricordiamo la penicillina e il colorante bromosulfotaleina, escreti come coniugato con glutatione e la cui velocità di escrezione veniva utilizzata come indice di funzionalità epatica. Un sistema di trasporto distinto è responsabile della escrezione degli acidi biliari, che pure sono composti anionici. I composti cationici vengono escreti attraverso un terzo meccanismo, che richiede la presenza di un gruppo basico (in genere un gruppo amminico carico) e di gruppi non polari che rendano il composto anfipatico; non tutti i derivati ammoniacali quaternari sono pertanto escreti attraverso questo meccanismo. Il meccanismo d'azione dei sistemi di trasporto per composti non ionizzati non è stato altrettanto chiarito: mentre alcuni composti possono venire coniugati e trasportati dal sistema di trasporto degli anioni (e non vengono escreti se i meccanismi di coniugazione sono difettosi o vengono inibiti), altri vengono escreti pur senza presentare gruppi ionizzati. Per alcuni di questi ultimi composti, quali ad

esempio i glicosidi cardioattivi, la escrezione potrebbe essere favorita dalla notevole asimmetria della molecola, caratterizzata dalla presenza di un gruppo idrofilo (residuo glicidico) da un lato e di un gruppo lipofilo (nucleo steroideo) dall'altro.

L'escrezione biliare appare essere la più importante via di eliminazione dei metalli, principalmente grazie alla coniugazione con il glutatone ridotto. È infine possibile che ormoni peptidici vengano escreti a livello biliare grazie a meccanismi di trans-citosi mediata da recettore.

L'escrezione biliare, al pari dell'attività metabolica degli epatociti, ha particolare importanza per i farmaci somministrati per via orale che attraverso il circolo portale raggiungono il fegato e possono subire una pesante metabolizzazione o escrezione prima di raggiungere il circolo sistemico (*eliminazione presistemica o effetto di primo passaggio*). Questo fenomeno può ridurre notevolmente la biodisponibilità orale di un farmaco che pure venga bene assorbito (vedi Capitolo 50). Di regola, l'eliminazione presistemica è saturabile; questo permette di somministrare per via orale anche farmaci che subiscano un pesante effetto di primo passaggio, quali il β -bloccante propranololo, a patto di aumentare notevolmente il dosaggio o di assumere il farmaco dopo i pasti, quando i sistemi di trasporto sono saturati dal carico alimentare. Si noti che però la biodisponibilità del farmaco sarà necessariamente meno prevedibile.

Una volta escreti nella bile, il farmaco non viene necessariamente eliminato dall'organismo in quanto, se le sue caratteristiche fisico-chimiche lo permettono, esso può venire riassorbito a livello intestinale. Ciò è particolarmente frequente per farmaci escreti dopo coniugazione con acido glicuronico. Infatti il coniugato può venire scisso dall'attività β -glicuronidasi presente nell'intestino. In questi casi si verifica un continuo *circolo enteroepatico* che può mantenere il composto (esogeno o endogeno) nell'organismo finché esso non viene metabolizzato o escreti per via renale; questa possibilità di ricircolo è essenziale per evitare la deplezione continua di sostanze

endogene, quali acidi biliari, vitamine D e B₁₂, acido folico ed estrogeni.

La compromissione della funzione epatica può interferire anche in misura notevole con la escrezione biliare di farmaci; purtroppo, la situazione è molto meno chiara rispetto alla escrezione renale, sia per il diverso grado di compromissione che si può presentare a carico di epatociti, albero biliare e vascolarizzazione, sia per l'impossibilità di misurare direttamente i livelli di escrezione dei farmaci nella bile.

Perfusione, legame alle proteine plasmatiche, attività enzimatiche e clearance epatica

L'insieme delle attività epatiche che portano alla eliminazione di un farmaco sono descritte in modo schematico nella figura 51.5. Un farmaco entra nel sistema capillare epatico con il flusso ematico in parte libero e in parte legato alle proteine plasmatiche; la parte libera sarà quella che avrà maggiori possibilità di entrare nell'epatocita per essere metabolizzata ed eventualmente eliminata con la bile; tuttavia le caratteristiche anatomiche dei sinusoidi epatici ricordate innanzi permettono un certo assorbimento anche delle proteine plasmatiche e quindi della quota di farmaco a esse legata.

Variazioni del flusso ematico possono significativamente alterare la clearance epatica del farmaco solo se l'indice di estrazione epatica è vicino a 1. In questo caso infatti, la velocità dei vari processi cellulari di eliminazione è molto rapida e il valore di clearance si avvicina a quello di flusso. Al contrario, se l'indice di estrazione è molto basso, la concentrazione venosa differisce di pochissimo da quella arteriosa (per definizione) e quindi l'importanza di variazioni del flusso è minima (Tabella 51.4).

Anche l'effetto di variazioni del legame alle proteine plasmatiche dipende dall'indice d'estrazione ed è più marcato per farmaci in cui tale valore è basso: in questo caso infatti l'evento limitante la velocità di eliminazione del farmaco non è la velocità di metabolizzazione o di secrezione, né, per definizione, il flusso ematico ma la sua capacità di penetrare nella cellula diffondendo attraverso

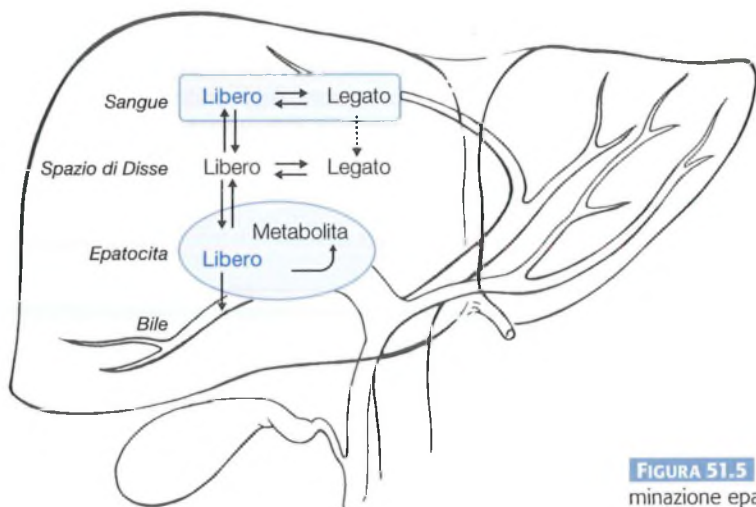


FIGURA 51.5 Rappresentazione schematica dei passaggi dell'eliminazione epatica dei farmaci.

le membrane cellulari, fenomeno che avviene prevalentemente per la quota libera di farmaco.

L'effetto di variazioni dell'attività enzimatica epatica, dovuta a patologie o a induzione metabolica iatrogena (alcuni farmaci possono aumentare il metabolismo di altri inducendo un aumento della sintesi degli enzimi coinvolti; vedi Capitolo 52), è importante quando l'attività enzimatica epatica è il fattore limitante della eliminazione.

Lo stesso dicasi per tutte le possibili variazioni genetiche a carico dei sistemi enzimatici epatici, così numerose da aver dato luogo a una cospicua sezione della *farmacogenomica*, intesa come valutazione sistematica degli effetti di variabilità genetiche sull'impiego terapeutico di farmaci. Poiché il fegato è l'organo più importante per il metabolismo dei farmaci, è ovvio che il medico dovrebbe agire con cautela quando somministra dei farmaci a un paziente con patologia epatica in atto. In realtà i dati a disposizione suggeriscono che, benché l'atteggiamento prudente sia corretto, non sempre esso è necessario. Il motivo di questa "variabilità" sta nella difficoltà di classificare le patologie epatiche in un'unica categoria per quel che riguarda gli effetti sull'eliminazione dei farmaci. Sotto l'aspetto delle alterazioni della clearance, appare ora sempre più chiaro che le patologie epatiche possono essere suddivise in due categorie con effetti diversi su tale valore: le patologie croniche (in particolare la cirrosi) e le patologie acute e reversibili (ad esempio, epatite virale). Con poche eccezioni, la clearance dei farmaci è ridotta nei pazienti cirrotici; la situazione è invece più complicata nelle patologie acute e nell'ittero ostruttivo, dove la clearance è ridotta per alcuni farmaci e inalterata per altri.

Come si vedrà nel Capitolo 53, il problema maggiore è quello di quantificare la variazione di funzionalità e

clearance epatiche; a differenza del rene, dove la funzionalità espressa come valore di clearance (della creatinina, dell'inulina, del PAI) può essere misurata anche da un normale laboratorio di analisi chimico-cliniche, è praticamente impossibile stabilire un valore percentuale di riduzione della funzionalità epatica. Inoltre, l'emivita di un farmaco è determinata da due variabili indipendenti, clearance e volume di distribuzione (vedi equazione [6]), che possono essere indipendentemente modificati nel corso di patologie epatiche. Alterazioni del volume di distribuzione si hanno soprattutto in corso di cirrosi con ridotta proteinemia per quei farmaci che sono molto legati alle proteine plasmatiche.

Rapporto tra metabolismo ed escrezione

L'eliminazione renale dei farmaci è, come abbiamo visto, fortemente influenzata dalla idrosolubilità e dal grado di ionizzazione; anche a livello epatico, la presenza di gruppi polari favorisce notevolmente l'escrezione. La maggior parte dei meccanismi di metabolizzazione, soprattutto in sede epatica, tende ad aumentare il grado di idrofilia o polarizzazione dei substrati, favorendone così la successiva escrezione. Sulla base di queste osservazioni, è facile comprendere come il metabolismo dei farmaci sia solo un aspetto dell'attività generale di metabolismo, orientata a rendere i composti sia endogeni che esogeni più facilmente e rapidamente eliminabili, favorendo così il ricambio e impedendo l'accumulo nell'organismo di sostanze assorbite o prodotte, fisiologicamente o patologicamente. Questo spiega come mai in alcuni casi l'attività metabolica epatica possa modificare il farmaco senza inattivarlo, o addirittura modificare un precursore inattivo generando il composto farmacologicamente attivo.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Entrato in circolo, il farmaco si distribuisce ai vari tessuti raggiungendo con diverse cinetiche differenti concentrazioni di equilibrio, che dipendono dalla avidità dei diversi tessuti per i singoli farmaci.
- ▶ Il volume di distribuzione apparente di un tessuto/compartimento è dato dal prodotto del suo volume reale per la sua avidità (rapporto di concentrazione rispetto al plasma, all'equilibrio).
- ▶ I farmaci possono legarsi alle proteine plasmatiche; questo influenza il volume di distribuzione apparente e la suscettibilità alla metabolizzazione e all'escrezione.
- ▶ La costante di eliminazione (frazione di farmaco eliminata nell'unità di tempo) è data dal rapporto tra clearance (volume di plasma "ripulito" nell'unità di tempo) e volume di distribuzione apparente.
- ▶ Nel rene, i farmaci sono filtrati a livello glomerulare. Farmaci lipofili, che passano agevolmente le membrane, vengono quasi completamente riassorbiti nel tubulo, insieme all'acqua (clearance = pochi ml/min); farmaci idrofili possono venire eliminati in quantità uguale a quella filtrata (clearance = 130 ml/min) oppure in quantità inferiore (se riassorbiti) o superiore (se secreti attivamente).
- ▶ A livello epatico vengono escreti farmaci o loro coniugati che presentano gruppi carichi e peso molecolare relativamente elevato. Essi possono però venire nuovamente assorbiti a livello intestinale (ricircolo enteroepatico).
- ▶ Il metabolismo epatico dei farmaci tende a renderli più idrofili e/o coniugarli con gruppi idrofili: questo ne permette la secrezione epatica e ne favorisce l'eliminazione renale.

Bibliografia essenziale

- ▶ Benet LZ, Hoener BA. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:115-21.
- ▶ Port RE, Wolf W. Non invasive methods to study drug distribution. *Divest New Drugs* 2003;21:157-68.
- ▶ Roerts SA. Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003;6:66-80.
- ▶ Smith QR. A review of blood-brain barrier transport techniques. *Methods Mol Med* 2003;89:193-208.
- ▶ Strolin Benedetti M, Baltes EL. Drug metabolism and disposition in children. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;17:281-99.

Il metabolismo dei farmaci

Enzo Chiesara, Laura Marabini, Sonia Radice

Obiettivi formativi

- Descrivere come una sostanza estranea all'organismo, quale è il farmaco, una volta assorbita e distribuita, possa, mediante determinate attività enzimatiche, essere eliminata in un tempo relativamente breve
- Analizzare le reazioni biochimiche mediante le quali gli enzimi farmaco-metabolici esplicano la loro attività biotrasformativa
- Evidenziare come il corredo enzimatico farmaco-metabolico possa essere modificato da fattori genetici e ambientali
- Chiarire le fasi che, in un circuito sequenziale, permettono una delle principali attività mediche: la terapia

Per essere assorbiti e distribuiti ai vari distretti dell'organismo, i farmaci devono possedere caratteristiche chimico-fisiche generalmente diverse da quelle che ne favoriscono l'eliminazione. Come descritto nel Capitolo 50, la lipofilia e l'assenza di cariche elettriche ne facilitano l'assorbimento a livello cutaneo, polmonare e gastrointestinale e ne permettono il raggiungimento dei siti di azione all'interno della cellula mediante il passaggio attraverso le membrane lipidiche. In assenza di efficaci sistemi di eliminazione l'esposizione ai farmaci lipofili avrebbe quindi come risultato finale il loro accumulo nell'organismo.

Esistono però sistemi di eliminazione rappresentati dall'escrezione urinaria, biliare e fecale, dall'espiazione polmonare e dalla traspirazione che, a eccezione della via polmonare, vengono favoriti se la sostanza acquista cariche elettriche e possiede caratteristiche idrofile. È quindi necessario che l'organismo provveda a una modificazione della loro struttura. Questo processo di *biotrasformazione* ha lo scopo di trasformare, all'interno dell'organismo, le sostanze estranee in composti più polari e più idrosolubili, aumentandone l'escrezione e riducendone il volume di distribuzione. Gli enzimi che provvedono alla biotrasformazione delle sostanze estranee vengono definiti *farmaco-metabolizzanti* anche se metabolizzano, oltre ai farmaci, numerosi altri composti endogeni o esogeni (xenobiotici) ai quali gli esseri viventi sono esposti. Sono proprio le variazioni nei contenuti delle diverse diete alimentari che hanno portato nel corso dell'evoluzione, a una significativa specifica complessità e a una marcata differenziazione di specie di questi en-

zimi (vedi **CD**: Approfondimento 52.1. *Fattori che possono modificare il metabolismo dei farmaci*).

A oggi la maggior parte degli xenobiotici ai quali gli esseri viventi sono esposti provengono da diverse fonti quali: farmaci, inquinanti ambientali, cibi, vuoi come nutrienti vuoi come additivi o contaminanti, prodotti cosmetici e prodotti chimici utilizzati in agricoltura.

Il metabolismo può modificare l'attività di un farmaco

Generalmente la metabolizzazione o meglio la biotrasformazione di un farmaco può portare alla formazione o di più metaboliti diversi fra loro che sono privi dell'attività farmacologica del composto iniziale o di metaboliti ancora farmacologicamente attivi e dotati di uno spettro farmacologico almeno parzialmente sovrapponibile a quello del composto d'origine. È questo il caso dell'eroina metabolizzata a morfina, dei metaboliti del propranololo e di alcuni antidepressivi che interferiscono con la ricaptazione delle ammine biogene. Particolarmente importante è il comportamento delle benzodiazepine ansiolitiche. Nel caso del diazepam, i due principali metaboliti sono nordiazepam e oxazepam, entrambi dotati delle medesime proprietà farmacologiche del composto d'origine, con un'emivita che, nei confronti di quella del composto d'origine, è circa il doppio per il primo e circa un quarto per il secondo. La durata d'azione del farmaco, dipenderà, quindi, da quale dei due composti viene generato dal corredo di enzimi del soggetto.

Vi è infine la possibilità che il farmaco non sia di per sé attivo, ma che lo diventi solo dopo biotrasformazione. In

questo caso, le biotrasformazioni assumono il nome di "bioattivazioni", e il composto iniziale viene definito *pro-farmaco*. Questo avviene, ad esempio, per alcuni farmaci antidepressivi come l'imipramina, per alcuni ormoni steroidei (prednisone e cortisone sono attivati rispettivamente a prednisolone e idrocortisone), per l'anticolinestrasico parathion (usato come pesticida), per l'azatioprina che è trasformata in mercaptopurina cui è legata la capacità di interferire con la sintesi degli acidi nucleici. Nel caso dei profarmaci l'attività farmacologica è quindi dipendente dalle capacità metaboliche dell'individuo.

Le biotrasformazioni possono portare anche alla formazione di metaboliti privi di attività farmacologica, ma dotati di attività tossica; ad esempio, l'epatotossicità dell'antinfiammatorio non steroideo paracetamolo è dovuta al suo metabolita ossidato che reagisce con altre strutture endocellulari.

Il metabolismo dei farmaci si attua attraverso due fasi

Le biotrasformazioni dei farmaci sono reazioni di tipo enzimatico e possono essere classificate in due fasi: fase I o di funzionalizzazione e fase II o di coniugazione. Dal punto di vista chimico appartengono alla fase I le reazioni di ossidazione, riduzione, idrolisi, idratazione, detioacetilazione e isomerizzazione. Le reazioni della fase I sono anche chiamate di funzionalizzazione perché hanno la finalità di inserire o di mettere in evidenza nel substrato gruppi funzionali di legame adatti alle reazioni di fase II, fra questi: -OH, -COOH, -SH, -NH₂. Le reazioni della fase II usano questi gruppi funzionali come un "terminale" per la loro attività di sintesi con molecole diverse.

Appartengono alla fase II numerose reazioni di coniugazione o sintesi fra le quali le più importanti sono: le reazioni di glicuronazione, di solfatazione, di metilazione, di acetilazione, di coniugazione con amminoacidi, di coniugazione con glutazione, di coniugazione con acidi grassi o di condensazione.

Se le reazioni di fase I portano alla modificazione biologico-chimica degli xenobiotici, è attraverso la fase II che la molecola aumenta il suo peso molecolare e modifica le sue caratteristiche di liposolubilità e di non ionizzazione in quelle di idrosolubilità e di possibile significativa ionizzazione al pH fisiologico dell'organismo, caratteristiche necessarie per accelerarne l'eliminazione.

Reazioni enzimatiche di fase I

Le reazioni biotrasformative di fase I possono essere riconducibili ad alcune reazioni fondamentali: ossidazione, riduzione, idrolisi, idratazione e, più rare, di tipo misto

Ossidazioni

Il sistema enzimatico ossidativo è rappresentato dal citocromo P450 (CYP), dalle monoossigenasi contenenti flavine (FMO) e dalle epossido idrolasi (EI). È presente prevalentemente nel reticolo endoplasmatico delle cellule

TABELLA 52.1 Reazioni ossidative

Reazione	Substrato
Idrossilazione aromatica	Lignocaina
Idrossilazione alifatica	Pentobarbital
Eossidazione	Benzo(a)pirene
Deaminazione ossidativa	Amfetamina
N-Ossidazione	2-acetilaminofluorene 3-metilpiridina
S-Ossidazione	Clorpromazina
N-Dealchilazione	Diazepam
O-Dealchilazione	Codeina
S-Dealchilazione	6-metilippurina
Ossidazione dei fosforotioati	Parathion
Dealogenazione	Alotano
Ossidazione alcolica	Etanolo

del fegato, del rene, del polmone e dell'intestino. Le reazioni ossidative di questo sistema operano diverse reazioni di metabolizzazione, come viene descritto nella tabella 52.1. A queste reazioni di tipo biotrasformativo a sede microsomiale vanno aggiunte quelle catalizzate da altre ossidasi a funzione mista, localizzate prevalentemente nei mitocondri, estremamente selettive nei riguardi del substrato e che possono essere coinvolte anche nella sua sintesi, come nel caso degli steroidi endogeni.

Citocromo P450

Il citocromo P450 è un sistema enzimatico fondamentale per l'ossidazione dei farmaci

Le reazioni controllate dal sistema enzimatico citocromo P450 dipendente sono molteplici, ma possono riconoscere tutte alla loro base la diretta incorporazione di una molecola di ossigeno attivo nel substrato. Le reazioni di ossidazione riguardano classi molto estese di composti endogeni, come il colesterolo, o di xenobiotici, come i farmaci (Tabella 52.1), i cancerogeni, gli inquinanti, i pesticidi (Figura 52.1) e i composti erboristici.

Le reazioni di ossidazione richiedono la presenza di ossigeno molecolare, di NADPH e del sistema ossidasi-rappresentato da due enzimi accoppiati, la NADPH citocromo P450 reductasi e il citocromo P450. L'insieme di questi enzimi è contenuto nella matrice fosfolipidica del reticolo endoplasmatico (Figura 52.2).

La presenza dei fosfolipidi è fondamentale per permettere sia le reazioni fra i due enzimi sia l'arrivo del substrato a livello del sito attivo.

La reazione ciclica catalizzata dal citocromo P450 è caratterizzata dalla capacità del ferro emnico di mediare reazioni cicliche di ossidoriduzione in relazione sia del

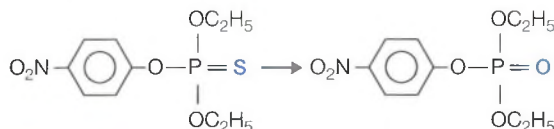


FIGURA 52.1 Ossidazione del parathion.

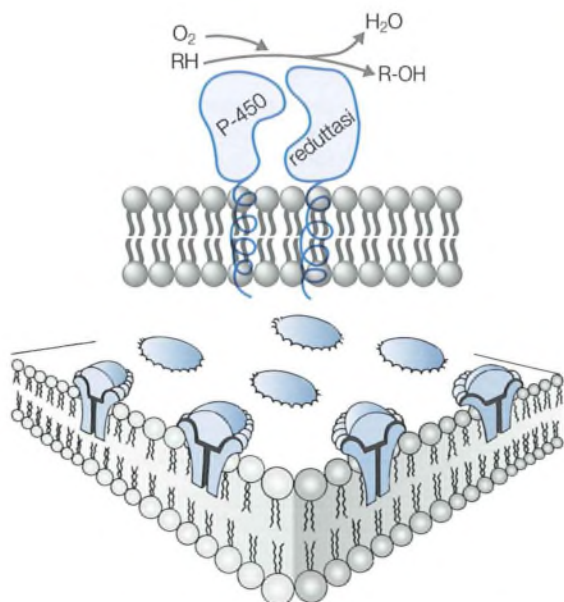


FIGURA 52.2 Disposizione spaziale del sistema di ossidasi miste microsomiali sul reticolo endoplasmatico liscio. (Da: Nebert DH, Eisen HJ, Negishi M et al. Genetic mechanisms controlling the induction of polysubstrate monooxygenase (P-450) activities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1981;21:431-62, modificata)

substrato, sia dell'ossigeno molecolare (Figura 52.3). Il substrato (RH) si lega alla forma ossidata del citocromo P450 (Fe^{3+}) per formare un complesso enzima-substrato. Il citocromo viene quindi ridotto allo stato di Fe^{2+} per acquisizione di un elettrone (e^-) messo a disposizione dalla flavoproteina NADPH citocromo P450 reductasi. Il complesso substrato-citocromo ridotto incorpora una molecola di ossigeno (O_2), cui fa seguito l'acquisizione di un altro elettrone, che proviene dal NADPH tramite la NADPH citocromo P450 reductasi. La metabolizzazione di un substrato da parte del citocromo P450 utilizza una molecola di ossigeno attivo con la formazione di un substrato ossidato e di acqua. Per molte reazioni enzimatiche citocromo P450 dipendenti si può avere, in relazione alla natura del substrato, un disaccoppiamento della ossidazione, con utilizzazione di più O_2 di quanto sia necessario alla entità del substrato e la conseguente formazione di ossigeno attivo (O_2^-) che a sua volta si trasforma in acqua a opera di una superossido dismutasi.

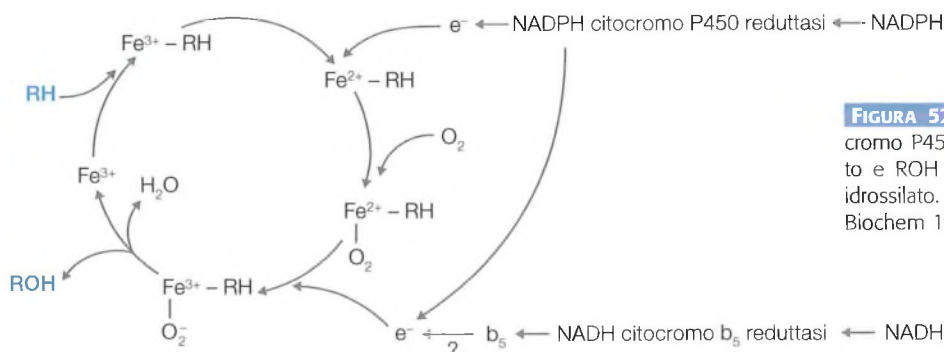


FIGURA 52.3 Ciclo catalitico del citocromo P450. RH rappresenta il substrato e ROH il corrispondente metabolita idrossilato. (Da: White e Coon. *Ann Rev Biochem* 1980;49:315-56, modificata).

■ La superfamiglia del citocromo P450

Mediante tecniche di DNA ricombinante si è giunti a identificare l'esistenza di una superfamiglia genica del citocromo P450 (CYP) che comprende diverse famiglie ciascuna composta da numerose sottofamiglie. L'omologia della sequenza amminoacidica tra le varie famiglie è intorno al 40%, mentre tra i membri di ciascuna sottofamiglia è circa il 60%.

L'attuale nomenclatura della superfamiglia del citocromo P450 prevede la sigla CYP seguita da un numero arabo (famiglia), da una lettera alfabetica maiuscola (sottofamiglia) e da un numero arabo (isoforma): ad esempio, CYP3A4. La comparazione simultanea delle sequenze amminoacidiche e l'ipotesi di una velocità costante di modificazione evolutiva hanno permesso di costruire un albero filogenetico della evoluzione del citocromo P450 (Figura 52.4); si noti come vi sia stata un'esplosione di nuovi geni negli ultimi 400 milioni di anni, con una duplicazione di numerosi geni nella famiglia 2 del P450.

L'esplosione è da ricondursi a quel fenomeno definibile come la "guerra tra piante e animali".

A un citocromo P450 nato nelle piante come sistema indirizzato alla sintesi e alla formazione di steroidi endogeni e di colesterolo a livello mitocondriale (sulla spinta evolutiva di una difesa verso eventuali stimoli esterni più o meno lesivi) ha fatto seguito lo sviluppo di un sistema di sintesi di nuove sostanze sempre di tipo difensivo (ad esempio, le fitoalessine) stimolato dalla comparsa delle specie animali e indirizzato a rendere i vegetali, inizialmente unica fonte alimentare, meno appetibili e meno digeribili. La risposta animale è stata quella di sintetizzare nuovi geni P450 capaci di demolire questo tipo di sostanze. Con il diffondersi degli animali sulla terra e l'incontro per la prima volta con nuove forme di piante terrestri questo aspetto della "guerra piante e animali" è andato via via intensificandosi e ha creato le premesse per l'esplosione di nuovi geni nelle ultime centinaia di milioni di anni. Da quel momento le diverse specie animali continuano a sviluppare varie forme di P450 soprattutto nella famiglia 2 del P450 (Tabella 52.2). Questo naturalmente è correlato con l'evoluzione delle diverse abitudini alimentari e con l'esposizione della specie umana a un elevatissimo numero di sostanze chimiche esogene (inquinanti, farmaci e nutrienti).

La specificità, la velocità e le affinità diverse per vari

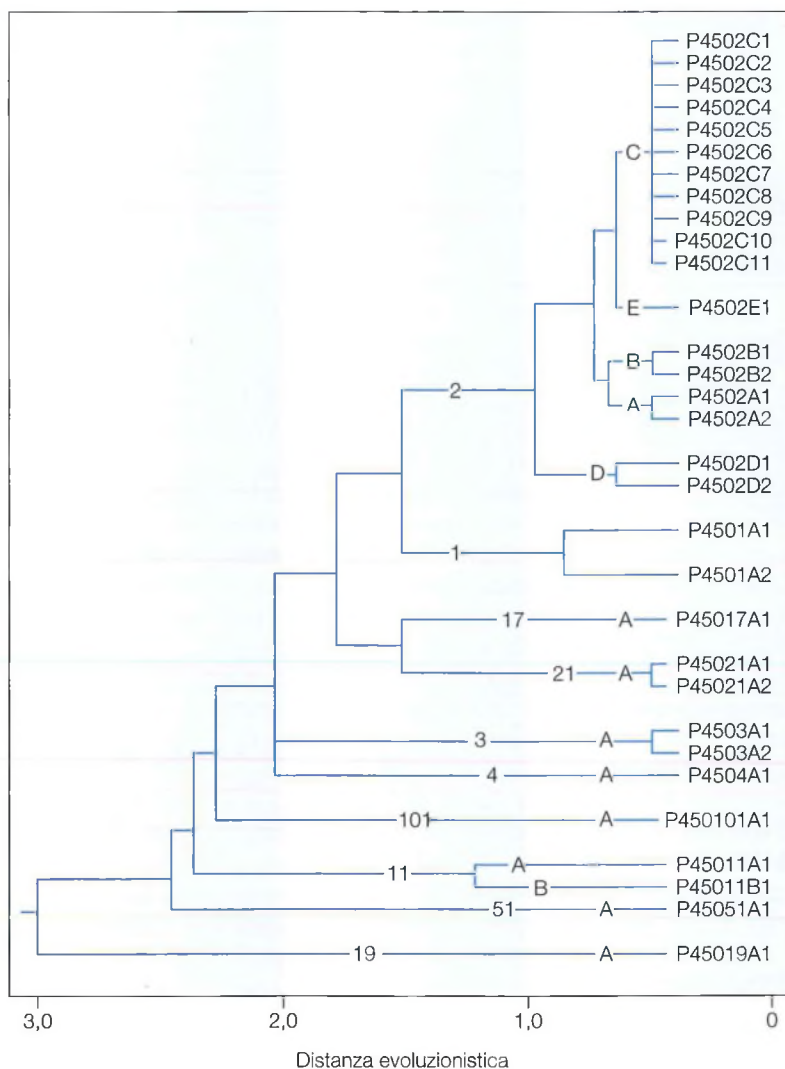


FIGURA 52.4 Evoluzione della superfamiglia del gene P450. Sono stati caratterizzati più di 110 membri. Si stima che la divergenza tra il gene dei batteri e degli eucarioti (distanza evolutiva = 2,5) sia avvenuta 1400 milioni di anni fa, data questa della più recente evidenza di microfossili eucarioti. (Da: Gonzales FJDW. TIG 1990;6:182-6, modificata)

substrati, vuoi su una particolare regione, vuoi su un particolare enantiomero o su ambedue, hanno portato prima all'ipotesi e poi, mediante tecniche di clonaggio di numerosi geni che codificano gli enzimi metabolizzanti e mediante identificazione di varianti alleliche a livello del DNA, alla certezza che il citocromo P450 sia rappresentato da numerose e diverse famiglie, sottofamiglie e isoforme che si caratterizzano per una identità di sequenze amminoacidiche \geq del 40% tra i membri delle famiglie e \geq del 60% tra i membri delle sottofamiglie. La molteplicità delle isoforme di CYP e la capacità di un singolo CYP di metabolizzare numerosi substrati a struttura diversa stanno alla base delle interazioni fra farmaci che portano alla comparsa di modificate aspettative terapeutiche, dall'insuccesso all'eccesso, di effetti avversi o, addirittura, di fenomeni tossici.

Il citocromo P450 prevede anche un gruppo di CYP orfani

Sono definite così le famiglie di CYP umani, quasi un quarto del totale, delle quali non si conoscono, al momento attuale, informazioni funzionali, modelli di espressione e regolazione.

Flavine contenenti monoossigenasi (FMO)

Appartengono agli enzimi di fase I e, come i CYP, sono caratterizzate da famiglie con la massima concentrazione nell'epatocita a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico e con azione mirata ai substrati idrofobici.

Si conoscono 6 famiglie di FMO, delle quali la FMO 3 è prevalente nel fegato. Le FMO sono coinvolte solo marginalmente nel metabolismo dei farmaci, fra i quali alcuni H_2 -inibitori (cimetidina e ranitidina), antipsicotici (clozapina) e antiemetici (itopride). Da sottolineare anche che formano quasi sempre metaboliti inerti.

A differenza dei CYP non subiscono il fenomeno della induzione e della inibizione (vedi paragrafo Induzione e inibizione farmaco-metabolica) a opera di altri farmaci utilizzati in terapia, per cui non sussiste il problema delle interazioni.

Epossido idrolasi

Le epossido idrolasi (EI) sono enzimi che agiscono sugli epossidi prodotti dagli enzimi CYP dipendenti trasformandoli nei rispettivi diidrodiooli e si dividono in sEI e in mEI, rispettivamente, a seconda che siano localizzate nella frazione solubile o sulle membrane dell'epatocita. Gli

TABELLA 52.2 Alcune delle principali famiglie del citocromo P450

Famiglia	Sottofamiglia	Reazioni	Presenza, caratteristiche
P4501	P4501A	Idrossilazione del benzo(a)pirene	Uomo, ratto, coniglio, topo
P4502	P4502A	Idrossilazione degli steroidi	Ratto, uomo
	P4502B	Demetilazione delle benzfetamine	Ratto, coniglio
	P4502C	Idrossilazione degli steroidi	Coniglio, ratto, uomo, pollo
	P4502D	Idrossilazione della debrisoquina	Ratto, uomo
	P4502E	Ossidazione dell'etanolo	Ratto, coniglio, uomo
P4503	P4503A	Idrossilazione degli steroidi	Ratto
P4504	P4504A	Idrossilazione dell'acido laurico	Ratto
P45011	P45011A	Distacco della catena laterale del colesterolo	Uomo, bovino
	P45011B	11 β -idrossilazione del deossicortisolo	Uomo, bovino
P45017	P45017A	17 α -idrossilazione del pregnenolone	Bovino
P45019	P45019A	Conversione degli androgeni in estrogeni	Uomo
P45021	P45021A	21-idrossilazione del progesterone	Bovino, topo, uomo
P45051	P45051A	Biosintesi delle giberelline, fitoalessine	Piante
P450101	P450101A	Idrossilazione della canfora	Batteri, lieviti

eossidi sono composti elettrofili altamente reattivi che si legano a gruppi cellulari nucleofili delle proteine, del DNA e dell'RNA e danno tossicità cellulare e mutazioni. Le EI sono quindi deputate, più che alla trasformazione dei farmaci, alla inattivazione di metaboliti potenzialmente tossici generati dai CYP.

Ossidazioni miste non dipendenti dal citocromo P450 e non presenti nel reticolo endoplasmatico

Esistono numerose altre ossidasi a funzione mista, localizzate prevalentemente nella frazione solubile delle cellule del fegato, del rene e del polmone, che, pur essendo principalmente coinvolte nel metabolismo dei composti endogeni, possono ossidare anche alcuni xenobiotici. Le principali sono l'alcoldeidrogenasi e l'aldeidodeidrogenasi, la xantinossidasi, l'aminossidasi, le aromatasi e le alchilidrazinossidasi.

Le *alcoldeidrogenasi* catalizzano l'ossidazione degli alcoli nelle rispettive aldeidi e sono localizzate prevalentemente nella frazione solubile delle cellule del fegato, del rene e del polmone. Diversamente dal sistema metabolizzante l'alcol etilico, caratteristico del sistema microsomiale epatico citocromo P450 dipendente, questi enzimi utilizzano come cofattore NAD⁺ e sono delle vere deidrogenasi prevalenti in situazioni fisiologiche di base. La ossidazione dell'alcol etilico mediata dal citocromo P450 è di scarsissima importanza, ma assume un ruolo rilevante quando si è in presenza di induzione anche da etanolo stesso (vedi **CD**: Approfondimento 52.2. *Induzione farmaco-metabolica*). Importanti in questo gruppo di meccanismi ossidativi sono anche gli enzimi denominati aminossidasi, suddivisi in monoaminossidasi e diaminossidasi, deputati rispettivamente alla metabolizzazione delle catecolamine e delle diamine endogene, quali ad esempio l'istamina, nelle corrispondenti aldeidi. Le monoaminossidasi metabolizzano anche le ammine esogene di origine alimentare (ad esempio, tiramina), e si localizzano, prevalentemente, nei mitocondri, nelle terminazioni nervose e nel fegato.

Riduzioni

A livello dei microsomi epatici sono presenti anche alcune attività biotrasformative di tipo riduttivo. Queste reazioni richiedono NADPH ma, diversamente da quello che accade per le ossidasi, vengono inibite dall'ossigeno. In questo meccanismo di biotrasformazione riduttiva i substrati da metabolizzare possono accettare uno o entrambi gli elettroni (e⁻) che vengono trasferiti nella catena ossidoriduttiva del citocromo P450, ma non l'ossigeno. Gli inibitori del citocromo P450 (vedi paragrafo Inibizione del metabolismo dei farmaci) inibiscono anche le reazioni riduttive poiché o competono a livello dei siti di legame con il substrato o si complessano con il ferro dell'eme bloccando il passaggio degli elettroni. I principali substrati dell'azione riduttiva sono i nitro- e gli azocomposti (Figura 52.5) che vengono ridotti enzimaticamente in maniera del tutto simile a una riduzione chimica.

Al processo riduttivo partecipano sia la flavoproteina e cioè la NADPH citocromo P450 reduttasi, sia l'ossidasi terminale e cioè il citocromo P450. Questa via biotrasformativa gioca un ruolo importante nel campo della tossicologia perché può dare luogo a metaboliti tossici o a intermedi reattivi. Ad esempio numerosi nitrocomposti vengono ridotti a derivati amminici, che a loro volta possono essere ossidati a metaboliti N-idrossilati con caratteristiche tossiche. Il tetracloruro di carbonio e l'alotano sono due classici esempi di biotrasformazione riduttiva con formazione di radicali liberi tossici.

Idrolisi

Gli esteri, le amidi, le idrazidi e i carbammati vengono idrolizzati da enzimi diversi, specifici o aspecifici, localizzati prevalentemente nel plasma e negli epatociti a livello del reticolo endoplasmatico e della frazione solubile. Le attività enzimatiche che sovrintendono a queste reazioni sono le esterasi e le amidasi.

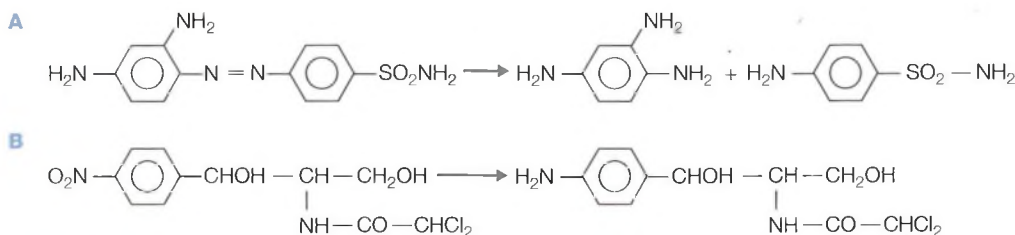


FIGURA 52.5 Riduzione del prontosi rosso (**A**) e del cloramfenicolo (**B**).

Le carbossiesterasi sono rappresentate da una superfamiglia di enzimi che catalizzano l'idrolisi delle sostanze che contengono esteri. L'esterasi più rilevante dal punto di vista fisiologico è l'acetilcolinesterasi che idrolizza l'acetilcolina (vedi Capitolo 34). Si presentano come esterasi aspecifiche a livello plasmatico che, ad esempio, riducono la procaina in acido benzoico e diaminoetanolo o esterasi specifiche che, ad esempio, riducono la petidina (meperidina) a livello del fegato.

L'idrolisi delle amidi avviene a opera delle amidasi prevalentemente presenti nel plasma che sono caratterizzate da una velocità enzimatica più lenta delle esterasi e hanno scarsa ricaduta sul metabolismo dei farmaci. Uno dei meccanismi enzimatici più caratteristici riguarda l'idrolisi del gruppo idrazinico dell'isoniazide.

Esistono anche idrolasi delle proteine e dei peptidi, prevalentemente presenti nella secrezione dello stomaco, ma scarsamente coinvolte nel metabolismo dei farmaci.

Reazioni enzimatiche di fase II

Le reazioni di fase II sono delle reazioni catalitiche tra cofattori, quali ad esempio, l'acido uridin-difosfoglicuronico (UDP-GA), enzimi di trasferimento, quale ad esempio, la UDPglicuronil-transferasi (UGT) e un substrato, per lo più un metabolita delle reazioni di fase I, dando luogo a un prodotto coniugato. Il meccanismo di reazione prevede il consumo di una certa quantità di energia che viene utilizzata per attivare i cofattori (in rari casi il substrato) a intermedi ad alta energia; l'attivazione è mediata direttamente o indirettamente dall'ATP. I gruppi reattivi funzionali $-OH$, $-COOH$, $-NH$ e $-SH$ sono per lo più originati dal metabolismo di fase I.

Le reazioni di fase II sono relativamente numerose (Tabella 52.3) e coinvolgono diversi gruppi di enzimi che, tranne poche eccezioni, trasformano i substrati in prodotti più idrosolubili, più ionizzabili al pH fisiologico e quasi sempre a peso molecolare più elevato; quindi eliminabili e difficilmente riassorbibili. Scopo comune delle reazioni di fase II, che sono caratterizzate da una velocità di reazione molto superiore a quella delle reazioni di fase I, è il porre termine all'attività biologica del farmaco.

Glicuronoconiugazioni

Le reazioni di glicuronoconiugazione sono, per la numerosità dei substrati sui quali agiscono, per la diversità e

numerosità dei gruppi funzionali disponibili alle sintesi e per la relativa elevata quantità disponibile del cofattore endogeno coinvolto (l'acido uridin-difosfoglicuronico), le più importanti fra le reazioni di coniugazione. L'enzima che catalizza le interazioni tra il cofattore ad alta energia e i gruppi funzionali delle molecole che devono ricevere la parte glicuronica è la UDP-glicuroniltransferasi (UGT). Diversamente da altri enzimi della fase II che sono prevalentemente citosolici, questa attività enzimatica è localizzata soprattutto nel reticolo endoplasmatico delle cellule di numerosi tessuti, quali il fegato, che ne è il più ricco, il rene, l'intestino, la cute, il cervello e la milza. L'acido uridin-difosfoglicuronico rientra nel metabolismo intermedio della sintesi del glicogeno ed è presente in tutti i tessuti dell'organismo; la sua sintesi, descritta nella figura 52.6, è a carico di enzimi citosolici. La formazione di glicuronidi riguarda sostanze tra le più svariate sia esogene sia endogene e tra queste gli alcoli, i fenoli, le idrossilamine, gli acidi carbossilici, le ammine, le sulfonamidi e i tioli. Sia per struttura sia per trasformazione metabolica (reazioni di fase I), queste molecole hanno in evidenza i gruppi funzionali $-COOH$, $-OH$, $-NH_2$, $-SH$ e formano glicuronidi all'ossigeno (O-glicuronidi), glicuronidi all'azoto (N-glicuronidi) e glicuronidi allo zolfo (S-glicuronidi). Oltre agli O-, N-, S-glicuronidi possono formarsi, anche se con scarsissima frequenza, in presenza di atomi di carbonio nucleofilo dei C-glicuronidi. La formazione dei glicuronidi è mediata dalla presenza di diverse isoforme di UDP-glicuroniltransferasi. Sono 19 i geni umani che codificano le UGT, nove sono codificate dal locus UGT1 e

TABELLA 52.3 Reazioni di fase II

Reazione	Enzima	Gruppo funzionale
Glicuronoconiugazione	UDP-glicuronil-transferasi	$-OH$, $-COOH$, $-SH$, $-NH_2$
Glicosilazione	UDP-glicosil-transferasi	$-OH$, $-COOH$, $-SH$
Solfatazione	Solfotransferasi	$-OH$, $-NH_2$, $-SO_2NH_2$
Metilazione	Metiltransferasi	$-OH$, $-NH_2$
Acetilazione	Acetiltransferasi	$-OH$, $-NH_2$, $-SO_2NH_2$
Coniugazione con glutazione	Glutazione-S-transferasi	Epossido organico
Coniugazione con amminoacidi	-	$-COOH$
Coniugazione con acidi grassi	-	$-OH$
Condensazione	-	Vario

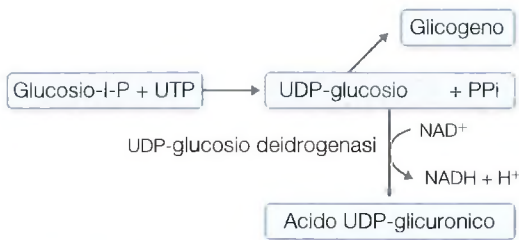


FIGURA 52.6 Sintesi dell'acido UDP-glicuronicico.

dieci dal locus UGT2. Di queste, quattro sono state clonate, sequenziate ed espresse in cellule di mammifero in coltura. Le diverse forme rispondono ai diversi agenti induttori (vedi paragrafo Induzione del metabolismo dei farmaci) e dimostrano selettività verso alcune classi di substrati. L'eterogeneità di questi enzimi spiega, oltre alla diversa sensibilità agli agenti ad attività inducente o inibitoria, le differenze di specie (vedi **CD**: Approfondimento 52.1) che portano a difetti selettivi nella glicuronoconiugazione per alcune classi di accettori dell'acido glicuronicico.

Tutti i glicuronidi possono subire successivamente un clivaggio a opera delle β -glicuronidasi, enzimi che sono presenti prevalentemente nella microflora intestinale. Questi enzimi possono idrolizzare con velocità diverse, a seconda che si tratti di N-, O- e S-glicuronidi, la molecola glicuronata e liberare un aglicone che può essere riassorbito e rientrare nel circolo enteroepatico (vedi paragrafo Microflora intestinale).

I composti coinvolti in questo ciclo tendono ad avere una vita più lunga nell'organismo, possono essere risottoposti a diversi processi di biotrasformazione prima di essere eliminati e possono rappresentare una importante complicazione delle terapie con farmaci ad attività epatotossica.

Solfatazioni

Un'altra importante via di coniugazione è rappresentata dalle reazioni di solfatazione che interessano prevalentemente i fenoli, ma anche gli alcoli, le ammine e in minor grado i tioli. La reazione è catalizzata dalle solfotransferasi (SULT), enzimi solubili presenti solo nel citosol delle cellule parenchimali di fegato, rene, intestino e polmone. La funzione delle SULT, di cui si conoscono nell'uomo 13 isoforme, è di trasferire il solfato inorganico ai gruppi idrossilici presenti sui fenoli o sugli alcoli alifatici dando luogo a dei solfati esterificati o a dei solfati eteri. Il cofattore di queste reazioni è il 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosolfato (PAPS) che è sintetizzato nel citosol a partire da solfato e ATP. La maggior fonte di solfato necessario alla sintesi del PAPS sembra derivare dalla cisteina attraverso una sequenza ossidativa relativamente complessa.

Per quanto riguarda le solfotransferasi sono già stati descritti numerosi isoenzimi dalle specifiche preferenze per i substrati. Le fenolo-, alcol- e arilamino-solfotransferasi sono di solito non specifiche e possono metabolizzare un ampio spettro di farmaci e di xenobiotici, mentre le solfotransferasi degli steroidi sono specifiche per i singoli steroidi o per gruppi di steroidi di tipo particolare.

Metilazioni

Le metilazioni sono reazioni di sintesi prevalentemente indirizzate alla metabolizzazione dei composti endogeni; tuttavia alcuni farmaci possono essere metilati da metiltransferasi non specifiche che si ritrovano nei polmoni o in altri tessuti. Diversamente dagli altri processi coniugativi le metilazioni sono reazioni che tendono a mascherare i gruppi funzionali dei substrati, diminuendone la idrosolubilità e la capacità di subire ulteriori processi coniugativi; non favorendone quindi l'escrezione.

I meccanismi delle metilazioni sono caratterizzati da reazioni nelle quali il gruppo metilico viene trasferito all'ossigeno degli alcoli, all'azoto dei gruppi amminici o ai gruppi tiolici delle sostanze solforate per mezzo di transferasi da un cofattore ad alta energia, la S-adenosilmetionina (SAM), con la formazione di un substrato metilato e di S-adenosilomocisteina. La SAM si ottiene dalla reazione tra L-metionina e ATP catalizzata da un enzima, la L-metionina adenosiltransferasi (Figura 52.7). Le metiltransferasi sono, diversamente dagli altri enzimi di trasferimento, relativamente specifiche e sono classificate dal substrato e dal rispettivo coniugato metilato. Nell'uomo sono espresse tre metiltransferasi, la catecol-O-metiltransferasi (COMT), la fenol-O-metiltransferasi (FOMT) e la tiopurina-S-metiltransferasi (TSMT).

Acetilazioni

Le reazioni di acetilazione rappresentano una via preferenziale di biotrasformazione dei farmaci e degli xenobiotici ambientali che contengono ammine aromatiche o gruppi idrazinici. Queste reazioni richiedono come cofattore l'acetil coenzima A che viene ottenuto dalla comune via della glicolisi oppure da una interazione diretta dell'acetato con il coenzima A mediante delle CoA-S-acetiltransferasi.

Il trasporto del gruppo acetilico dall'acetil coenzima A è mediata da enzimi di trasporto, le N-acetiltransferasi (NAT), enzimi citosolici presenti in molti tessuti di numerose specie. Ammine primarie aromatiche, idrazine, idrazidi, sulfonamidi e alcune ammine primarie alifatiche sono i substrati più comuni delle N-acetiltransferasi. Nell'uomo le NAT sono presenti nei due geni, la NAT1 e la NAT2.

Nella figura 52.8 vengono riportate a titolo di esempio le acetilazioni della sulfanilamide e dell'isoniazide.

Un polimorfismo nell'acetilazione di alcuni substrati è stato ritrovato nell'uomo, nel topo, nel coniglio e nella

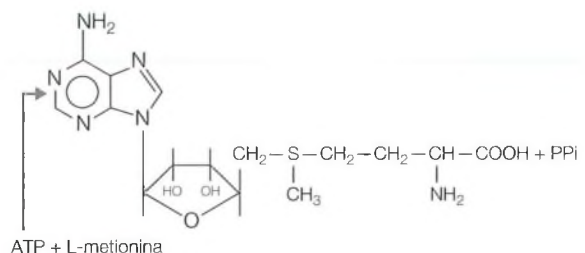


FIGURA 52.7 Sintesi dell'S-adenosilmetionina.

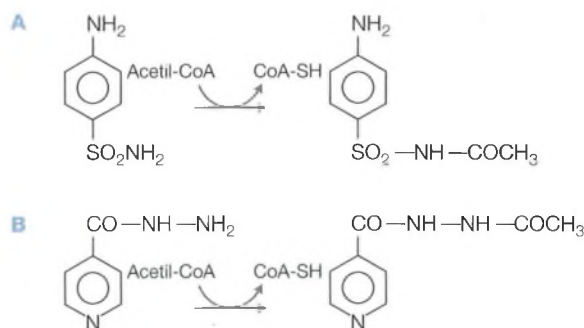


FIGURA 52.8 N-acetilazione della sulfonamide (A) e dell'isoniazide (B).

scimmia. Questo polimorfismo ha permesso, sulla base della velocità di acetilare l'isoniazide, di classificare gli individui in acetilatori "veloci" o "lenti". L'esistenza di un polimorfismo nelle N-acetiltransferasi ha permesso di spiegare la diversa tossicità di alcune sostanze in individui della stessa specie, come ad esempio il danno periferico nervoso indotto da isoniazide negli acetilatori "lenti". Anche la diversa attività cancerogena da ammine aromatiche può essere dipendente da un polimorfismo nell'attività delle N-acetiltransferasi.

Le reazioni di acetilazione possono talvolta mascherare i gruppi funzionali e portare a degli N-acetilderivati meno idrosolubili dei composti originali con possibili ricadute tossicologiche. Gli N-acetilderivati di alcuni sulfamidici, meno idrosolubili dei farmaci originali, possono ad esempio dare precipitati nei tubuli renali e quindi danno renale.

Coniugazioni con aminoacidi

Gli acidi carbossilici di origine esogena possono formare dei derivati con il coenzima A e reagire con ammine endogene per formare dei coniugati; in questo caso, a differenza di quanto accade per le altre coniugazioni, è il substrato e non il cofattore a essere attivato. Normalmente gli aminoacidi coinvolti sono la glicina, la glutammina, l'ornitina, l'arginina e la taurina.

Nell'uomo prevale la coniugazione con la glutammina, mentre negli uccelli e nei rettili prevale la coniugazione con l'ornitina. La taurina serve come accettore acilico per la coniugazione degli acidi biliari. Le reazioni di formazione del legame peptidico prevedono due tappe accoppiate fra loro e catalizzate da diversi enzimi. Come prima reazione si ha l'attivazione dell'acido al derivato tioestere del coenzima A con consumo di energia fornita dall'ATP, successivamente il tioestere del coenzima A trasferisce la sua parte acilica al gruppo aminico dell'amminoacido ricevente. Gli enzimi che supportano queste modificazioni a tappe consequenziali sono le CoA-ligasi ATP dipendenti e le N-aciltransferasi. Ambedue sono enzimi solubili, anche se attività simili sono presenti nella matrice dei mitocondri epatici e renali. Un esempio rappresentativo di questo meccanismo enzimatico è la coniugazione dell'acido benzoico con la glicina (Figura 52.9).

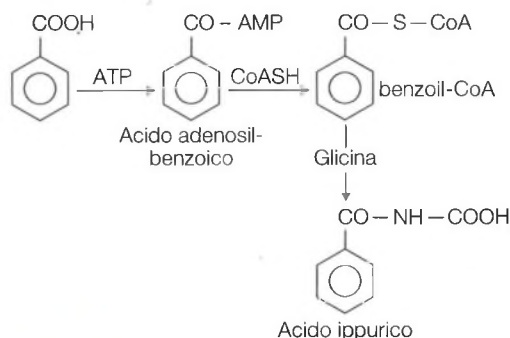


FIGURA 52.9 Coniugazione dell'acido benzoico con la glicina.

Coniugazioni con glutazione

Il glutatione è un tripeptide formato da glicina, acido glutammico e cisteina, ed è considerato uno dei più importanti composti dell'organismo per la sua capacità di rimuovere i composti elettrofili potenzialmente tossici. Possono reagire con il glutatione per formare coniugati non tossici numerose sostanze endogene ed esogene (fra le quali i farmaci) dotate di forte elettrofilia, acquisita anche a opera delle reazioni di fase I. Le sostanze che si coniugano più facilmente con il glutatione sono rappresentate da epossidi, alo-alcani, nitro-alcani, alcheni e composti alo- e nitro-aromatici. I coniugati con il glutatione possono essere o escreti direttamente nelle urine e nella bile o subire ulteriori processi metabolici.

Le coniugazioni con il glutatione sono mediate dalle glutatione-S-transferasi (GST) che catalizzano la sintesi del sulfidril nucleofilo del glutatione con il composto elettrofilo che contiene un eteroatomo elettrofilico (-O, -N e -S). Allo stato attuale sono state identificate più di 20 GST divise in due sottofamiglie, la forma citosolica e quella microsomiale, caratterizzate sia da selettività nella scelta dei substrati sia da diversa velocità di reazione, da 5 a 40 volte superiore quelle citosoliche. Le GST citosoliche sono deputate al metabolismo degli xenobiotici e dei farmaci, mentre le GST microsomiali a quello dei composti endogeni, quali i leucotrieni e le prostaglandine. Questi enzimi sono ubiquitari con la massima attività nel sangue, nel fegato, nell'intestino, nel rene e nel surrene.

Biotrasformazioni extraepatiche

■ Organi coinvolti nelle biotrasformazioni

Anche se la velocità e la capacità totale delle biotrasformazioni extraepatiche non sono elevate come nel fegato, esse rappresentano un fattore importante sia nell'eliminazione degli xenobiotici sia nel determinismo delle azioni tossiche di molte sostanze alle quali gli esseri umani sono esposti, anche se a bassi livelli, per lunghi periodi di tempo. Ci si riferisce agli inquinanti ambientali dell'aria, dell'acqua e dei cibi, ai contaminanti chimici di origine industriale e al fumo di sigaretta. I tessuti extraepatici che contengono in maggiore quantità le attività biotrasformative sono quelli

coinvolti anche nell'assorbimento o nella escrezione delle sostanze estranee quali il polmone, la cute, la mucosa gastrointestinale e il rene (Tabella 52.4).

È da sottolineare che, diversamente da quello che accade nel fegato dove tutte le cellule parenchimali sono dotate di attività biotrasformativa, negli altri tessuti le biotrasformazioni sono presenti solo in alcune cellule che rappresentano singole tipologie della popolazione cellulare, almeno per quanto riguarda le reazioni di fase I.

Gli enterociti dell'epitelio intestinale sono dei siti importanti di metabolismo di fase I perché, selettivamente a livello dell'intestino tenue, contengono il CYP3A.

Ne discende che, dopo somministrazione orale di un farmaco, i vari CYP localizzati nell'intestino e nel fegato possono regolare in sequenza la quantità di farmaco che raggiunge il circolo sistemico modulando in tal modo l'azione del farmaco somministrato. Questa fase è chiamata di *primo passaggio*.

Differenze fra soggetti nel metabolismo dei farmaci, di sintesi o naturali, sia nell'intestino sia nel fegato sono comuni, spesso importanti e contribuiscono alla diversa risposta individuale alla terapia, dagli effetti avversi, tra i quali gli insuccessi terapeutici, alle inaspettate interazioni che portano a variazioni nei moduli terapeutici o a comparsa di effetti tossici (vedi Capitolo 55 e *vedi CD*: Approfondimento 52.3. *Modificazioni di efficacia dovute alle interazioni tra farmaci di sintesi e farmaci di origine vegetale*).

■ Il ruolo della flora microbica intestinale

Una localizzazione extraepatica di biotrasformazione è rappresentata dai microrganismi intestinali. È stato valutato che la microflora intestinale ha una potenzialità biotrasformativa equivalente o maggiore di quella del fegato, anche se molto selettiva. Si calcola che siano più di 400 le specie batteriche che formano la flora del tratto intestinale e che possono variare in funzione della specie, dell'età, della dieta e di stati patologici. A causa della situazione anaerobia del tratto intestinale, le biotrasformazioni microbiche intestinali sono prevalentemente reazioni di tipo riduttivo e producono metaboliti più o meno idrosolubili. Queste attività reduttasiche sono anche in grado di deconjugare mediante β -glicuronidasi e arilsulfatasi i

metaboliti prodotti dai sistemi enzimatici epatici ed escreti nel tratto gastrointestinale, che possono essere riassorbiti e andare incontro a un ricircolo enteroepatico responsabile, in alcuni casi, delle epatopatie da farmaci, come quelle da cloramfenicolo che sta alla base della "sindrome grigia del bambino" o da sulfamidici.

Induzione e inibizione farmaco-metabolica

Induzione del metabolismo dei farmaci

Una caratteristica degli enzimi della superfamiglia del P450 deputati al metabolismo degli xenobiotici è una espressione basale relativamente bassa in assenza di substrato, elevata in presenza dei substrati specifici o di altri composti che inducono un aumento degli enzimi stessi.

La prima osservazione che gli animali si adattano all'aumento delle dosi di fenobarbital (tolleranza), aumentando la concentrazione totale di citocromo P 450 e, conseguentemente, accelerando la sua stessa biotrasformazione, è di vecchia data e risale ormai a più di 50 anni fa.

Un aumento di attività metabolica è stato poi descritto nel caso delle aminoossidasi, ma successivamente è stato riconosciuto che il fenomeno è comune a molte monossigenasi P450 dipendenti e coinvolge anche enzimi di tipo coniugativo. Si è successivamente messo in luce che una caratteristica importante degli enzimi biotrasformativi, in particolare i membri delle sottofamiglie dei geni CYP1A, CYP2B, CYP2C/H, CYP3A e CYP4A, è un aumento della loro attività in seguito al trattamento con sostanze estranee di natura e di origine diversa come farmaci, pesticidi, sostanze chimiche di origine industriale e prodotti di origine naturale destinati all'alimentazione (ad esempio, l'etanolo). Questo incremento di attività metaboliche, definito come *induzione farmaco-metabolica*, è il risultato di un aumento nella sintesi di enzimi biotrasformativi e, normalmente, è tessuto specifico, rapido, dose dipendente e reversibile quando l'induttore venga rimosso.

L'aumento dell'attività metabolizzante indotto da un farmaco si può manifestare con un'accelerazione del metabolismo sia dello stesso farmaco sia di altri composti funzionalmente non correlati. Un buon esempio sperimentale di questo fenomeno è l'effetto inducente del fenobarbital e di altri farmaci ad azione sedativa centrale sulla metabolizzazione di un noto convulsivante, quale la stricnina, e di un altro barbiturico, come il pentobarbital. Come appare nelle tabelle 52.5 e 52.6, un pretrattamento di 48 ore dell'animale (ratto) con diverse sostanze diminuisce l'azione tossica sia della stricnina sia del pentobarbital. Oltre al fenobarbital e ad altre sostanze più o meno simili ai barbiturici, un altro gruppo largamente studiato e capace di dare induzione è quello degli idrocarburi aromatici policiclici (ad esempio, il benzo(a)pirene e il 3- metilcolantrene).

Le ricerche condotte per evidenziare i possibili induttori tra i farmaci e le sostanze chimiche hanno dimostrato che la maggioranza di questi composti è lipofila (Tabella 52.7). Si sa oggi che le sostanze estranee possono influenzare il contenuto di enzimi attivando la trascrizione e l'espres-

TABELLA 52.4 Localizzazione dei CYP più rappresentativi dei tessuti extraepatici umani

CYP	Tessuto
1A1	Polmone, rene, tratto GI, pelle, placenta, linfociti, altri
1B1	Pelle, rene, mammella, prostata, utero, feto
2A6	Polmone, membrana nasale, altri
2B6	Tratto GI, polmone
2C	Tratto GI (mucosa del piccolo intestino), laringe, polmone
2D6	Tratto GI
2E1	Polmone, placenta, altri
2F1	Polmone, placenta
2J2	Cuore
3A	Tratto GI, placenta, feto, utero, rene, polmone
4B1	Polmone, placenta
4A11	Rene

sione dei geni che codificano gli specifici CYP. Attivazione mediata da un sistema di ligandi e recettori nucleari che, una volta entrati in contatto, formano dei complessi che a loro volta attivano, mediante la RNA-polimerasi II, determinati geni bersaglio (Tabella 52.8).

Con l'aiuto del polimorfismo genetico, dei ligandi ad alta affinità e delle cellule inducibili in coltura, dei recettori agli idrocarburi aromatici (AhR) e dei loro mediatori di legame e dei traslocatori nucleari, si è chiarito il meccanismo molecolare dell'induzione dei CYP1A da parte degli idrocarburi policiclici aromatici (vedi **CD**: Approfondimento 52.2). La successiva messa in luce del recettore di attivazione della proliferazione dei perossisomi (PPAR) ha chiarito che questo recettore nucleare gioca un ruolo cruciale nella induzione dei CYP4A da parte delle sostanze ad attività proliferativa, come ad esempio i fibrati (Tabella 52.8).

Oltre a quanto visto per i fibrati nel caso del PPAR, il pregnano X recettore (PXR), che è attivato da numerosi farmaci fra i quali gli antibiotici (rifampicina e trioleandomicina), i calcio-antagonisti (nifedipina), le statine (mevastatina), gli antidiabetici orali, gli inibitori delle proteasi (ritonavir) e alcuni farmaci anticancro (tassani), e il recettore costitutivo dell'androstano (CAR) hanno confermato il comune meccanismo della induzione farmacometabolica (Tabella 52.8).

È stata evidenziata anche l'esistenza di recettori nucleari di tipo 2 che appartengono alla superfamiglia dei recettori per gli ormoni steroidei. Questi recettori, identificati sulla base della somiglianza di struttura e chiamati *recettori orfani* perché non riconoscevano dei ligandi endogeni, sono coinvolti nel metabolismo dei farmaci e quindi nella terapia.

Analoghe a quelle degli enzimi farmaco-metabolici esistono differenze di specie (vedi **CD**: Approfondimento 52.1) nei rapporti tra ligandi e recettori. La rifampicina, ad esempio, attiva il PXR umano, ma non quello del topo o del ratto. Questo rappresenta un ulteriore punto delicato da considerare quando si passa dalla sperimentazione nell'animale a quella nell'uomo.

In altri casi, invece, gli induttori, come l'etanolo che è attivo sul CYP2E1, stabilizzano gli enzimi a livello post-trascrizionale e non coinvolgono un meccanismo recettore dipendente (vedi **CD**: Approfondimento 52.3).

Inibizione del metabolismo dei farmaci

L'inibizione è definibile come una diminuzione di attività enzimatica legata a diversi meccanismi quali: diretta inibizione dell'enzima, distruzione dell'enzima, diminuito apporto di cofattori, soppressione della sintesi enzimatica. Nella pratica clinica i più comuni sono i primi due meccanismi. La inibizione diretta è legata alla larga versatilità degli enzimi farmaco-metabolici che può portare una singola forma di P450 a metabolizzare centinaia di composti diversi, dai farmaci agli inquinanti, dai composti endogeni alle componenti non nutritive delle piante. Se da una parte questo permette la eliminazione di un vasto numero di composti, dall'altra favorisce la comparsa di inibizione

TABELLA 52.5 Effetto di un pretrattamento (48 ore) con farmaci ad azione centrale sulla tossicità della stricnina

Pretrattamento	N° animali	N° ratti in convulsione	N° ratti morti	Mortalità (%)
Controlli	45	36	34	76
Fenobarbital	24	1	0	0
Fenaglicodolo	23	3	2	9
Glutetimide	24	4	2	8
Tiopentale	16	5	3	18
Niketamide	24	8	7	19
Primidone	16	6	4	25
Difenilidantoina	16	7	5	31
Uretano	16	9	7	44
Meprobamato	16	9	8	50
Carisprodolo	16	11	9	55
Pentobarbital	16	11	10	62

TABELLA 52.6 Effetto di un pretrattamento (48 ore) con farmaci ad azione centrale sul tempo di sonno da pentobarbital

Pretrattamento	Tempo di sonno (minuti) Media ± deviazione standard	Variazione (%)
Controlli	82 ± 2,8	
Fenaglicodolo	13 ± 3,1	- 84
Glutetimide	26 ± 4,1	- 68
Tiopentale	22 ± 3,8	- 73
Fenobarbital	28 ± 3,2	- 66
Niketamide	36 ± 3,4	- 56
Meprobamato	46 ± 4,6	- 44
Pentobarbital	47 ± 4,8	- 43
Clorbutolo	51 ± 6,1	- 37
Clorpromazina	49 ± 4,5	- 40
Fluopromazina	55 ± 4,6	- 33
Uretano	52 ± 6,3	- 37
Fenitoina	58 ± 5,4	- 29
Esobarbital	56 ± 5,8	- 31
Primidone	62 ± 6,3	- 26
Mefenesina dicarbammato	66 ± 5,3	- 19
Carisprodolo	66 ± 4,5	- 19

TABELLA 52.7 Sostanze inducenti le biotrasformazioni epatiche nell'animale

Classificazione	Esempio	Uso/Origine
Farmaci	Fenobarbital	Sedativo / ipnotico
	Rifampicina	Antibiotici
	Triacetiloleandomicina	
Insetticidi	DDT, aldrin, lindano	Pesticidi
Idrocarburi policiclici aromatici	Benzo(a)pirene 3-metilcolantrene Benzantracene	Inquinanti ambientali ritrovati in prodotti di combustione di uso domestico e industriale Distillazione del petrolio
Alcol	Etanolo	Disinfettanti della pelle Bevande
Idrocarburi alogenati	TCDD	Contaminanti di erbicidi e defoglianti
Additivi alimentari	Idrossianisolo butilato	Antiossidanti degli alimenti

TABELLA 52.8 Elementi coinvolti nell'induzione farmacometabolica

Recettori	Ligandi	Enzimi indotti
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Ailidrocarburo recettore (AhR) ▶ Recettore costitutivo dell'androstano (CAR) ▶ Pregnano X recettore (PXR) ▶ Farnesile X recettore (FXR) ▶ Vitamina D recettore ▶ Recettore di attivazione della proliferazione perossisomiale (PPAR) ▶ Recettore acido retinoico (RAR) ▶ Retinoidi X recettori (RXR) 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Omeprazolo ▶ Fenobarbital ▶ Rifampicina ▶ Desametasone ▶ Acidi biliari ▶ Vitamina D ▶ Fibrati ▶ Acido <i>all-trans</i> retinoico ▶ Acido <i>cis</i> retinoico 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ CYP1A1 ▶ CYP1A2 ▶ CYP3A4 ▶ CYP1B1 ▶ CYP2B6 ▶ CYP2C9 ▶ CYP4A ▶ Glutazione S-transferasi ▶ Glucuroniltransferasi ▶ Sulfottransferasi ▶ Farnesiltransferasi

competitiva di grado diverso in rapporto con la relativa affinità delle sostanze estranee per il sito di legame ed è un fenomeno che si può presentare nell'uomo durante terapie con diversi farmaci in somministrazione contemporanea. Evenienza questa legata al fatto che i P450 possiedono un sito allosterico di legame per i rispettivi substrati che può allocare una singola molecola allo stesso tempo. Esistono eccezioni come quella del CYP3A4 che può allocare più di una molecola. L'inibizione competitiva può non evidenziarsi sul farmaco inibitore nel caso che l'enzima inibito non sia il maggiore responsabile della biotrasformazione dell'inibitore. È paradigmatico, a questo proposito, il comportamento della chinidina che si lega in maniera reversibile al CYP2D6 e inibisce, quindi, il metabolismo dei substrati del CYP2D6, ma è metabolizzata dal CYP3A4. L'inibizione può avvenire anche per competizione per i siti attivi o per i cofattori degli enzimi, per blocco delle componenti di trasporto in sistemi multienzimatici o per modificazioni allosteriche nelle strutture enzimatiche (Tabelle 52.9 e 52.10).

È opportuno sottolineare che, se l'inibizione in vitro è un fenomeno abbastanza semplice e facilmente individuabile, non altrettanto lo è in vivo.

Molte sostanze estranee producono effetti selettivi di tipo inibitorio per alcuni isoenzimi del citocromo P450 in funzione della specie animale. Inoltre il grado di inibizione è variabile con il tempo, e numerosi agenti, che inizialmente inibiscono il citocromo P450, danno in un tempo successivo un fenomeno di tipo induttivo (ad esempio, l'SKF 525A o il butossido di piperonile).

L'inibizione per distruzione dell'enzima è il caso nel

quale il metabolita di un substrato si lega strettamente o addirittura in maniera irreversibile a un enzima la cui riattivazione richiede la resintesi dell'enzima stesso. Numerose sostanze estranee, farmaci e tossici, sono capaci di distruggere il citocromo P450 nel fegato mediante diversi meccanismi. Uno, conosciuto sotto il nome di *inibizione suicida*, è mediato da alcune sostanze ad attività porfirogenica che contengono delle funzioni olefiniche o acetileniche e che formano nel fegato un "pigmento verde" recentemente identificato come prodotto di alchilazione derivato dall'interazione substrato-eme del citocromo P450. La maggioranza di queste sostanze è relativamente inattiva per sé e richiede un'attivazione metabolica tramite lo stesso citocromo P450. Questo meccanismo spiega il motivo della definizione data alle sostanze di substrati "suicidi" per l'emoproteina. Da sottolineare che l'azione tossica di questi metaboliti sembra estremamente selettiva per il citocromo P450 e di brevissima sopravvivenza in quanto le concentrazioni di citocromo b₅ o di altre emoproteine di membrana del reticolo endoplasmatico non sono di solito modificate. Fra le varie sostanze che inibiscono le reazioni catalizzate dal P450 mediante inattivazione suicida devono essere ricordati alcuni alcani alogenati (CCl₄), alcheni (vinilcloruro, tricloroetilene) e composti ad attività terapeutica contenenti dei gruppi allilici come il secobarbital o acetilenici come il noretindrone acetato. Altre sostanze, invece, inibiscono le reazioni di biotrasformazione mediante la riduzione della sintesi sia degli enzimi di biotrasformazione sia degli enzimi necessari alla produzione di cofattori. A questo gruppo, oltre agli inibitori più comuni della sintesi proteica, appartengono alcune

TABELLA 52.9 Substrati delle sottofamiglie di CYP umani maggiormente coinvolte nel metabolismo dei farmaci

CYP 1A1/2	CYP 2C8/9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 3A4/5,7
<ul style="list-style-type: none"> ▶ Aloperidolo ▶ Amitriptilina ▶ Clozapina ▶ Estradiolo ▶ Fluvoxamina ▶ Naproxene ▶ Olanzapina ▶ Ondansetron ▶ Propranololo ▶ Teofillina ▶ Verapamil ▶ Warfarin ▶ Zileuton ▶ Zolmitriptano 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Amitriptilina ▶ Celecoxib ▶ Cerivastatina ▶ Diclofenac ▶ Fluoxetina ▶ Glibenclamide ▶ Glipizide ▶ Ibuprofene ▶ Irbesartan ▶ Losartan ▶ Paclitaxel ▶ Piroxicam ▶ Repaglinide ▶ Tolbutamide ▶ Torsemide 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Citalopram ▶ Clomipramina ▶ Clopidogrel ▶ Fenitoina ▶ Fenobarbitone ▶ Imipramina ▶ Indometacina ▶ Indometacina ▶ Lansoprazolo ▶ Nilutamide ▶ Omeprazolo ▶ Pantoprazolo ▶ Proguanil ▶ Propranololo ▶ Teniposide ▶ Ticlopidina 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Aloperidolo ▶ Alprenololo ▶ Amitriptilina ▶ Clomipramina ▶ Clorpromazina ▶ Desipramina ▶ Fluoxetina ▶ Imipramina ▶ Paroxetina ▶ Propafenone ▶ Risperidone ▶ Tamoxifene ▶ Timololo 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ Alprazolam ▶ Amlodipina λ ▶ Atorvastatina ▶ Chinidina ▶ Ciclosporina ▶ Cisapride ▶ Claritromicina ▶ Eritromicina ▶ Estradiolo ▶ Indinavir ▶ Midazolam ▶ Nifedipina ▶ Ritonavir ▶ Tacrolimus ▶ Triazolam

TABELLA 52.10 Inibitori delle sottofamiglie di CYP umani maggiormente coinvolte nel metabolismo dei farmaci

CYP 1A1/2	CYP 2C8/9	CYP 2C19	CYP 2D6	CYP 3A4/5,7
▶ Amiodarone	▶ Amiodarone	▶ Cimetidina	▶ Amiodarone	▶ Amiodarone
▶ Chinolonici	▶ Fenilbutazone	▶ Cloramfenicolo	▶ Bupropione	▶ Aprepitant
▶ Cimetidina	▶ Fenofibrato	▶ Fluoxetina	▶ Celecoxib	▶ Cimetidina
▶ Ciprofloxacina	▶ Fluconazolo	▶ Ketoconazolo	▶ Chinidina	▶ Claritromicina
▶ Fluvoxamina	▶ Fluvastatina	▶ Lansoprazolo	▶ Cimetidina	▶ Diltiazem
▶ Interferon	▶ Fluvastatina	▶ Modafinil	▶ Cinacalcet	▶ Eritromicina
	▶ Gemfibrozil	▶ Omeprazolo	▶ Citalopram	▶ Fluconazolo
	▶ Glitazone	▶ Pantoprazolo	▶ Clomipramina	▶ Indinavir
	▶ Isoniazide	▶ Ticlopidina	▶ Flecaïnide	▶ Itraconazolo
	▶ Lovastatina	▶ Topiramato	▶ Fluoxetina	▶ Ketoconazolo
	▶ Montelukast		▶ Metadone	▶ Nefazodone
	▶ Sertralina		▶ Ondansetron	▶ Nelfinavir
	▶ Sulfametossazolo		▶ Paroxetina	▶ Progesterone
	▶ Tamoxifene		▶ Ranitidina	▶ Ritonavir
	▶ Teniposide		▶ Sertralina	▶ Saquinavir
	▶ Trimetoprim		▶ Ticlopidina	▶ Verapamil
	▶ Zafirlukast			

sostanze più selettive nel loro meccanismo di inibizione. Il 3-ammino-1-2-3-triazolo, ad esempio, diminuisce la sintesi del citocromo P450 inibendo la sintesi delle porfirine, mentre la diminuzione epatica di citocromo P450 a opera del cobalto è correlabile a un effetto inibitorio sulla sintesi dell'eme.

Un altro meccanismo di inibizione può essere secondario a un impoverimento di cofattori necessari alle reazioni di coniugazione, come avviene per la l-metionina-sulfoximina e la butionina-sulfoximina che inibiscono la sintesi del glutatone, o il dimetilmaleato, il glicidolo e altre sostanze simili che si coniugano con il glutatone riducendone rapidamente i depositi tissutali. Analogo è il meccanismo per la galattosamina che inibisce la sintesi dell'acido UDP-glicuronic svuotando i depositi epatici di uridina, o per il borneolo e la salicilamide che coniugandosi con l'acido UDP-glicuronic ne riducono la disponibilità.

Numerose sostanze chimiche possono agire direttamente sul sistema ossidoriduttivo del citocromo P450. Il monossido di carbonio e le etilisocianidi si comportano,

ad esempio, come ligandi per l'eme ridotto e pertanto competono con l'ossigeno molecolare diventando potenti inibitori delle reazioni ossidative e, nel caso del monossido di carbonio, anche delle reazioni di tipo riduttivo.

Infine alcune classi di farmaci o di sostanze estranee possono inibire le biotrasformazioni mediante la formazione di complessi inattivi con l'emoproteina. Queste sostanze sono substrato del citocromo P450 e devono essere biotrasformate per esercitare il loro effetto inibitorio, comportandosi in maniera simile alle sostanze olefiniche e acetileniche.

Un esempio interessante di questa inibizione e della sua ricaduta clinica è legato alla osservazione che il trattamento con triacetiloleandomicina, un antibiotico a struttura analoga all'eritromicina, può produrre colestasi del fegato in presenza di contraccettivi orali, episodi ischemici in presenza di ergotamina, compromissione neurologica in presenza di carbamazepina e teofillina; queste interazioni tossiche suggeriscono che l'effetto dell'antibiotico sia di ridurre drasticamente il metabolismo e quindi l'escrezione di questi farmaci.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Le sostanze estranee, una volta assorbite e distribuite, possono venire eliminate per via metabolica.
- ▶ Le reazioni biochimiche deputate alle modificazioni chimico-fisiche delle molecole esogene ed endogene sono svolte da complessi enzimatici dei quali fanno parte numerose isoforme di CytP450.
- ▶ Questi sistemi enzimatici, in apparenza rigidamente consequenziali, sono particolarmente plastici e modulano la loro risposta a seguito di fattori genetici e ambientali.

Bibliografia essenziale

- ▶ Daly AK, Cholerton S, Gregory W, Idle Jr. Metabolic Polymorphism. *Pharmacol Ther* 1993;57:129-60.
- ▶ Gibson GG, Skett P. Introduction to Drug Metabolism. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1994.
- ▶ Li JH, Lu AY. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41:535-67.
- ▶ Stark K, Guengerich FP. Characterization of orphan human cytochromes P450. *Drug Metabolism Reviews* 2007;39:627-37.
- ▶ Whitlock JP. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:103-25.
- ▶ Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 2005;352:2211-21.

Controllo della concentrazione plasmatica dei farmaci

CAPITOLO

53

Riccardo Fesce, Guido Fumagalli

Obiettivi formativi

- ▶ Imparare a prevedere e a quantificare l'andamento delle concentrazioni plasmatiche di un farmaco in base ai suoi dati farmacocinetici
- ▶ Conoscere le differenze nell'andamento delle concentrazioni plasmatiche in funzione della dose e della distanza tra le somministrazioni
- ▶ Saper utilizzare i dati farmacocinetici per definire il corretto regime terapeutico e le sue modifiche in funzione dell'età e delle patologie

I livelli plasmatici ottenuti a seguito della somministrazione di un farmaco e le loro variazioni nel tempo dipendono dalle caratteristiche dei processi di assorbimento, distribuzione ed eliminazione e sono molto diversi a seconda che il farmaco venga somministrato una sola volta o ripetutamente. Benché lo studio delle regole generali che governano l'insieme di questi processi possa richiedere un certo sforzo intellettuale, la loro conoscenza è tuttavia di estrema importanza e utilità perché consentirà di impostare in modo corretto il regime terapeutico a cui sottoporre ciascun paziente.

Andamento temporale della concentrazione plasmatica dei farmaci dopo singola somministrazione

Il farmaco viene assorbito con una velocità che dipende dalla via di somministrazione e dalle sue caratteristiche chimico-fisiche

La rilevanza della via di somministrazione sulle cinetiche di assorbimento è stata descritta in dettaglio nel Capitolo 50. La velocità di assorbimento dipende dalla via di somministrazione, dalle caratteristiche anatomo-funzionali della sede di assorbimento e dalle caratteristiche fisico-chimiche del farmaco e del suo eccipiente. Da quanto descritto nel Capitolo 49 sulla diffusione dei farmaci attraverso barriere cellulari, si può prevedere che, a seguito di una somministrazione di una dose di farmaco, la sua concentrazione plasma-

tica salirà con una velocità che dipende dal numero e dalla struttura delle barriere cellulari che vanno superate, e dalla presenza di eventuali meccanismi di trasporto più o meno specifici. Di conseguenza, la stessa dose di farmaco può produrre livelli plasmatici massimi diversi a seconda della via di somministrazione (Figura 53.1). Generalmente il picco è più alto per la somministrazione endovenosa e più basso per le somministrazioni enterali; valori intermedi si hanno con le altre vie parenterali (vedi Capitoli 50 e 51).

In generale l'andamento del passaggio in circolo di un farmaco è ben descritto da una cinetica di I ordine; quindi nell'unità di tempo viene assorbita una quantità di farmaco proporzionale alla differenza di concentrazione tra compartimento assorbente (ad esempio, lume intestinale) e compartimento plasmatico. Ciò significa che la quantità assorbita sale più rapidamente all'inizio e poi pian piano raggiunge il valore totale $D_s \times F$, dove D_s è la dose somministrata ed F la frazione assorbita (biodisponibilità). La quantità di farmaco non ancora assorbita tende a scendere esponenzialmente, e la quantità assorbita tende a salire secondo la funzione complementare:

$$Q_A = D \cdot (1 - \exp(-t/\tau_a)) \quad [1]$$

dove D è la dose somministrata (o meglio, la dose totale assorbita, $D = D_s \times F$), t è il tempo intercorso dalla somministrazione e τ_a è la costante di tempo di assorbimento (vedi Capitolo 50, Box). La costante di tempo dipende dalle caratteristiche delle barriere da superare, e va da un valore teorico di zero per la somministrazione endovenosa a valori dell'ordine di decine di minuti per la somministra-

zione orale; costanti di tempo di assorbimento di ore, giorni o settimane si possono ottenere con le preparazioni "deposito" a lenta dissoluzione e rilascio prolungato. Va tenuto presente che la formula [1] costituisce un'approssimazione abbastanza sommaria, che trascura l'interferenza dei processi di distribuzione ed eliminazione del farmaco sull'andamento delle concentrazioni plasmatiche.

Il farmaco si distribuisce a organi e tessuti e viene eliminato

Una volta immesso nel torrente circolatorio, il farmaco si distribuisce in concentrazioni diverse nei vari distretti dell'organismo e raggiunge l'equilibrio di distribuzione con una velocità che dipende, per ogni compartimento, dal flusso di farmaco (a sua volta limitato dal flusso ematico regionale o dalla permeabilità delle barriere cellulari) e dal volume apparente di distribuzione del compartimento (vedi Capitolo 51, Figura Box 1). Poiché le cinetiche di assorbimento dei farmaci dipendono anche dalla differenza tra le concentrazioni presenti a livello del sito d'assorbimento e del sangue che irrorata tale sito, esse saranno influenzate anche dalla velocità con cui un farmaco esce dal letto vascolare per distribuirsi ai tessuti. Quindi farmaci diversi somministrati per una stessa via possono avere velocità di assorbimento diverse in funzione non solo delle caratteristiche fisico-chimiche del singolo farmaco ma anche delle diversità dei volumi apparenti di distribuzione. In generale, farmaci con alto V_d raggiungono concentrazioni plasmatiche di equilibrio più basse (la concentrazione plasmatica è inversamente proporzionale a V_d) e con costanti di tempo di assorbimento più lunghe (la salita della concentrazione plasmatica è rallentata perché a mano a mano che il farmaco entra in circolo lo lascia anche per distribuirsi). Ricordiamo che, come descritto nel Capitolo 51, l'entità del V_d influenza non solo l'assorbimento, ma anche la velocità di eliminazione del farmaco.

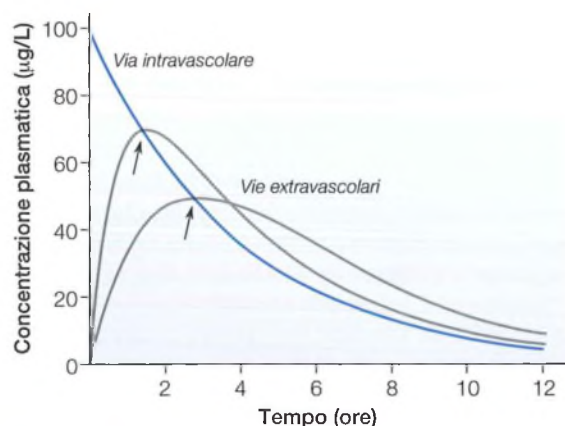


FIGURA 53.1 Andamento delle concentrazioni plasmatiche dello stesso farmaco somministrato per via intravascolare (massimo al tempo zero) o attraverso diverse vie extravascolari (assumendo biodisponibilità completa). Si noti che le curve per vie di assorbimento extravascolari mostrano picco di concentrazione ritardato e più basso. Al picco esse incrociano l'andamento conseguente a somministrazione intravascolare (frecce) e di qui in poi determinano concentrazioni più alte; questo permette alle tre curve di sottendere un'area equivalente.

Anche l'eliminazione segue in genere una cinetica di I ordine: essa dipende, oltre che dai fattori fisico-chimici ricordati nella trattazione della escrezione renale ed epatica e del metabolismo, da fattori idrodinamici (gittata cardiaca, flusso renale ecc.), che influenzano la clearance, e ancora una volta dal volume di distribuzione apparente: si ricorda che la costante di tempo di eliminazione di un farmaco è data dal rapporto $V_d/\text{clearance}$. Quindi maggiore è il V_d e minore è la Cl , più lenta è l'eliminazione del farmaco e più a lungo può durare il suo effetto.

Descrizione dell'andamento della concentrazione plasmatica

Dopo una singola somministrazione, è intuitivo che la concentrazione plasmatica del farmaco salirà fino a un valore massimo (picco) e quindi scenderà poiché viene eliminato. In generale, la salita avrà una costante di tempo uguale alla più breve tra le costanti di assorbimento e distribuzione/eliminazione, la discesa rispetterà l'altra costante di tempo; il valore di picco, a parità di dose somministrata, sarà tanto più alto quanto più diverse sono le due costanti di tempo, e verrà raggiunto tanto più lentamente quanto più lento è l'assorbimento (e quanto più lenta è l'eliminazione, a parità di velocità di assorbimento).

In prima approssimazione, la concentrazione plasmatica di un farmaco dopo singola somministrazione segue un andamento biesponenziale, ben descritto dall'equazione:

$$C_p(t) = \frac{D}{V_d} \cdot \frac{\tau_e}{\tau_e - \tau_a} [\exp(-t/\tau_e) - \exp(-t/\tau_a)] = \frac{D}{Cl} \cdot \frac{\exp(-t/\tau_e) - \exp(-t/\tau_a)}{\tau_e - \tau_a} \quad [2]$$

dove $C(t)$ è la concentrazione plasmatica del farmaco al tempo t , D è la dose assorbita, V_d è il volume apparente di distribuzione del farmaco, τ_e e τ_a sono rispettivamente le costanti di tempo di eliminazione e di assorbimento, Cl è la clearance del farmaco, che si calcola dal rapporto V_d / τ_e . Per semplicità, nella trattazione che segue si assumerà che i farmaci siano completamente assorbiti (biodisponibilità 100%). Nel caso di assorbimento incompleto (biodisponibilità < 100), il valore di D (dose) calcolato dovrà essere corretto per la biodisponibilità del farmaco. Si ricorda che i valori sia di biodisponibilità che di τ_a di un farmaco possono variare in funzione della via di somministrazione utilizzata.

Occorre notare che nella [2], che consente di determinare momento la concentrazione plasmatica dovuta a una dose di farmaco, il volume di distribuzione V_d viene considerato come un valore costante: l'equazione è quindi utile solo per stabilire la concentrazione plasmatica dopo che si è instaurato l'equilibrio di distribuzione tra i vari compartimenti dell'organismo (compreso quello plasmatico), o se comunque la distribuzione è più rapida rispetto ad assorbimento ed eliminazione.

È opportuno qui richiamare le considerazioni svolte nel Capitolo 50 sulle relazioni che intercorrono tra via di somministrazione, velocità di assorbimento, concentrazione plasmatica massima ottenibile a parità di dose e tempo

BOX 1 Cinetica multicompartmentale

I fenomeni di redistribuzione mostrano con chiarezza come l'approssimazione dell'andamento della concentrazione plasmatica del farmaco a semplice differenza di due esponenziali (vedi equazione [2]), governati dalle costanti di tempo di assorbimento ed eliminazione, possa essere profondamente inadeguata anche nel caso più semplice della somministrazione singola.

La descrizione precisa del comportamento della concentrazione plasmatica in un sistema multicompartmentale come l'organismo umano si può ottenere solo considerando contemporaneamente i flussi di farmaco tra il plasma e ciascuno dei compartimenti (tessuti o organi diversi). Schematicamente, ciascuno di questi flussi riflette l'equilibrarsi di un compartimento con il plasma ed è sostanzialmente regolato da una cinetica di I ordine; per ogni compartimento, la costante di tempo è determinata dal rapporto tra volume apparente e flusso plasmatico (salvo significativo rallentamento dovuto a barriere). Pertanto, l'andamento della concentrazione plasmatica del farmaco sarà adeguatamente descritto dalla somma di diversi esponenziali, ognuno con coefficiente di ampiezza e costante di tempo diversi. In particolare, per ogni compartimento la costante di tempo sarà uguale al rapporto volume/perfusione del compartimento (velocità uguale alla perfusione specifica). Viceversa, per ogni compartimento il coefficiente di ampiezza dell'esponenziale esprimerà l'influenza del compartimento sull'andamento complessivo delle concentrazioni del farmaco nell'organismo, e sarà essenzialmente proporzionale al volume apparente di distribuzione del compartimento stesso.

La descrizione cinetica dell'organismo può essere allora semplificata raggruppando in pochi compartimenti astratti tutti gli organi e tessuti che sono caratterizzati da perfusioni specifiche simili; ognuno di questi compartimenti virtuali avrà un volume apparente di distribuzione uguale alla somma dei V_d degli organi/tessuti che lo compongono. Si possono così distinguere, oltre ai compartimenti *ematico*, di *assorbimento* e di *eliminazione*, un compartimento *cerebrale* (altamente perfuso), uno *muscolare* (grande volume, quasi 50% del peso corporeo, perfusione medio-bassa, un certa tendenza ad accumulare farmaci lipofili), uno *viscerale* (basso volume, elevata perfusione), un *compartimento ad alta perfusione* (organi quali cuore, rene e surrene, volume molto piccolo ma altissima perfusione), un compartimento *adiposo* (volume molto variabile, perfusione molto bassa, grande tendenza ad accumulare farmaci lipofili) e i *tessuti poco perfusi* (come l'epidermide, volume di diversi litri, perfusione molto bassa). Benché le cinetiche complessive siano dominate dai compartimenti ematico e muscolare/viscerale, e siano spesso ragionevolmente approssimate considerando semplicemente un unico compartimento con volume uguale ai liquidi corporei accessibili al farmaco, l'approccio multicompartmentale ci permette di predire l'andamento della concentrazione del farmaco nel compartimento specifico dove esso deve agire (ad esempio, il SNC), e di rendere conto di fenomeni di sequestro, accumulo e redistribuzione.

Inoltre, in specifiche condizioni fisiologiche e patologiche la perfusione di alcuni compartimenti può cambiare notevolmente: si pensi all'aumento della perfusione muscolare e alla riduzione della perfusione viscerale nella reazione di "lotta o fuga" prodotta dall'adrenalina, o alla violenta riduzione del flusso viscerale, cutaneo e renale in stato di shock. In tali situazioni, le cinetiche di distribuzione dei farmaci possono risultare notevolmente alterate.

necessario per il raggiungimento del picco plasmatico dopo la somministrazione. A questo scopo è utile introdurre un parametro di grande utilità pratica in farmacocinetica: l'area sotto la curva di concentrazione plasmatica.

Area sotto la curva di concentrazione plasmatica (ASC)

Come più volte affermato, una cinetica di eliminazione di I ordine implica che una frazione costante della quantità di farmaco presente nell'organismo viene eliminata nell'unità di tempo. Indichiamo tale frazione come costante di eliminazione, $\kappa_e = 1/\tau_e$.

In ogni istante la quantità di farmaco presente nell'organismo è uguale alla concentrazione plasmatica per il volume di distribuzione apparente, $Q_t = C_t \cdot V_d$, e la quantità eliminata nell'unità di tempo sarà $Q_t \cdot k_e = C_t \cdot V_d \cdot k_e$. Poiché abbiamo definito la clearance (volume di plasma "ripulito" nell'unità di tempo) come $Cl = V_d \cdot k_e$, nell'unità di tempo si elimina una quantità $Q_t \cdot k_e = C_p \cdot Cl$, in accordo con la definizione stessa di clearance.

Disegniamo ora la curva della concentrazione plasmatica rispetto al tempo. Per quanto appena detto, ogni valore della curva, moltiplicato per Cl , ci fornisce la velocità di eliminazione nel momento corrispondente; di conseguenza la curva di concentrazione plasmatica nel tempo, moltiplicata per la clearance, diviene la curva di velocità di eliminazione (quantità per unità di tempo) del farmaco. L'area sottesa a tale curva di eliminazione (la somma delle quantità eliminate in ogni momento) deve essere equivalente alla quantità totale di farmaco eliminato. Pertanto, la quantità totale di farmaco eliminato è uguale all'area sottesa alla curva di concentrazione plasmatica (area sotto la curva, ASC), moltiplicata per Cl , e questo valore è ovviamente uguale alla quantità totale di farmaco assorbita (e somministrata, se la biodisponibilità è completa). In altre parole, dopo l'assorbimento di una quantità di farmaco $Q = D \cdot F_A$, dove D è la dose somministrata e F_A la frazione assorbita, l'ASC dovrà ammontare a $D \cdot F_A / Cl$, indipendentemente dalla via di somministrazione.

La misura dell'area sotto la curva si rivela utile per una serie di aspetti.

- ▶ Calcolo della frazione assorbita. Un modo molto semplice per calcolare la frazione assorbita attraverso una specifica via di somministrazione è calcolare il rapporto tra l'ASC misurata per questa via e l'ASC misurata dopo somministrazione endovenosa o intramuscolare. Otterremo così il rapporto tra le quantità di farmaco assorbite attraverso le due diverse vie di somministrazione e, poiché per via ev o im l'assorbimento è totale, tale rapporto misura la frazione assorbita, F_A , per la via di somministrazione alternativa. Qualora sia nota la clearance del farmaco, basterà misurare l'ASC per conoscere $F_A = ASC \cdot Cl / D$.
- ▶ Calcolo della clearance del farmaco. Dopo aver determinato la frazione assorbita (o impiegando una via parenterale che dia assorbimento completo), la clearance del farmaco è facilmente calcolata dal rapporto $Cl = D \cdot F_A / ASC$.
- ▶ Calcolo del volume di distribuzione apparente. In precedenza si è suggerito un calcolo approssimato del V_d come rapporto tra dose iniettata ed estrapolazione al tempo zero della curva di concentrazione plasmatica, dopo somministrazione endovenosa (si costruisce la curva su scala semilogaritmica, si presume che quando la curva comincia a scendere in modo rettilineo il farmaco si sia distribuito a tutto il suo V_d , e si prolunga all'indietro la retta di decadimento fino al tempo zero, quando il farmaco non ha ancora iniziato a essere eliminato); un calcolo più preciso si può eseguire misurando il tempo di dimezzamento sulla parte di caduta esponenziale della curva di concentrazione plasmatica: si considera che $t_{1/2} = 0,693 / k_e = 0,693 \cdot V_d / Cl$, si calcola la clearance dall'ASC, come appena descritto, e si deriva $V_d = t_{1/2} \cdot Cl / 0,693$.
- ▶ Calcolo teorico della curva di concentrazione plasmatica. Un farmaco assorbito con costante di tempo τ_a e eliminato con costante di tempo τ_e produrrà un andamento della concentrazione plasmatica che segue la funzione $\exp(-t/\tau_e) - \exp(-t/\tau_a)$; questa funzione ha integrale (area sotto la curva) $\int_0^\infty [\exp(-t/\tau_e) - \exp(-t/\tau_a)] dt = \tau_e - \tau_a$; poiché l'ASC deve valere $ASC = D \cdot F_A / Cl = D \cdot F_A \cdot \tau_e / V_d$, la curva di concentrazione plasmatica sarà descritta dalla funzione:

$$C_p(t) = \frac{D \cdot F_A}{V_d} \cdot \frac{\tau_e}{\tau_e - \tau_a} [\exp(-t/\tau_e) - \exp(-t/\tau_a)]$$

ovvero la già vista equazione [2].

Inoltre, una importante conseguenza della relazione tra quantità assorbita e AUC è che, a parità di biodisponibilità, cambiando la via di somministrazione (e la velocità di assorbimento) l'area sotto la curva di concentrazione plasmatica per lo stesso farmaco nello stesso paziente (e quindi a parità di clearance) non deve cambiare. Le curve di concentrazione plasmatica presentate nella figura 53.1 rappresentano gli andamenti ottenibili somministrando la stessa dose di farmaco attraverso vie diverse (con velocità di assorbimento diverse e biodisponibilità

completa in tutti i casi) e illustrano chiaramente questo aspetto: le vie di somministrazione più lente comportano concentrazioni plasmatiche più basse inizialmente, ma necessariamente le concentrazioni plasmatiche saranno più alte nelle fasi tardive, cosicché l'area totale sotto le curve è sempre uguale.

Il picco di concentrazione plasmatica

Si è già trattata nel Capitolo 50 la relazione esistente tra velocità di assorbimento e altezza del picco plasmatico ottenibile. Possiamo qui riprendere l'argomento in maggior dettaglio sulla base delle osservazioni svolte in precedenza.

Una somministrazione in bolo intravascolare (costante di tempo di assorbimento, $\tau_a \approx 0$) riduce la [2], che descrive sommariamente l'andamento della concentrazione plasmatica del farmaco, alla seguente:

$$C(t) = \frac{D}{V_d} \cdot \exp(-t/\tau_e) \quad [3]$$

Questa equazione assume che il farmaco si distribuisca istantaneamente in tutto il suo V_d ; di conseguenza l'equazione prevede una concentrazione plasmatica iniziale uguale a D / V_d . L'equazione in realtà non descriverà accuratamente l'andamento della concentrazione plasmatica nelle fasi iniziali successive alla somministrazione.

L'ASC dopo somministrazione in bolo intravascolare è data dall'integrale (per t che va da 0 a infinito) della [3]. Tale integrale vale $D \cdot \tau_e / V_d = D / Cl$, dove Cl (clearance) è data per definizione dal rapporto V_d / τ_a . Chi abbia familiarità con il calcolo integrale può verificare che anche l'integrale della [2] ha lo stesso valore, D/Cl , il che conferma che per qualunque valore di τ_a l'ASC rimane inalterata.

Una importante informazione che deriva dalla [2] è la seguente: il picco di concentrazione plasmatica si ottiene dopo un tempo, T_p , che dipende dalle velocità di assorbimento ed eliminazione, e in particolare è tanto più tardivo quanto più lento è l'assorbimento [$T_p = \tau_a \cdot \log(\tau_e / \tau_a) / (1 - \tau_a / \tau_e)$]. In questo momento, la concentrazione plasmatica, secondo la [2], è data dalla formula:

$$C(T_p) = \frac{D}{V_d} \cdot \exp(-T_p / \tau_e) \quad [4]$$

che, come si può notare, è identica al valore della [3] per $t = T_p$ (a patto che la biodisponibilità sia completa, ovvero $F_A = 1$). Questo significa che le curve di concentrazione plasmatica ottenute dopo somministrazione extravascolare incrociano quella ottenuta con un bolo intravascolare al momento del picco. Quindi, come si può vedere nella figura 53.1, per le somministrazioni extravascolari al momento del picco plasmatico la concentrazione plasmatica è la stessa che avremmo se la somministrazione fosse avvenuta via bolo intravascolare; nelle somministrazioni extravascolari, però, al momento del picco plasmatico parte del farmaco resta ancora da assorbire, per cui le concentrazioni plasmatiche da questo momento in poi si manterranno più elevate rispetto all'andamento prodotto da un bolo intravascolare.

Andamento temporale della concentrazione plasmatica dei farmaci a seguito di somministrazioni ripetute

Abbiamo fin qui discusso come calcolare, momento per momento, la concentrazione plasmatica indotta in un paziente da una dose di farmaco. Nella pratica clinica quotidiana è in realtà più frequente trovarsi nella necessità di dover non solo raggiungere ma anche mantenere a lungo (per giorni o anche anni) un certo valore di concentrazione plasmatica. Non si tratta più di somministrare una singola dose di farmaco, ma di instaurare una terapia cronica e di prevedere quale sarà l'effetto di ciascuna singola dose sulla concentrazione plasmatica prodotta dalle dosi precedenti.

La somministrazione ripetuta di dosi porta a un accumulo finito di farmaco

Per semplicità didattica, consideriamo l'andamento delle concentrazioni plasmatiche di un farmaco somministrato per via endovenosa e che *rapidamente* si equilibra nel suo volume di distribuzione (Figura 53.2).

La concentrazione plasmatica raggiunge un valore di picco che è funzione della dose (D) e del volume di distribuzione (V_d), cioè D/V_d , e poi decade in modo esponenziale:

$$C_t = C_0 \cdot \exp(-kt) \quad [5]$$

ovvero, richiamando la definizione di tempo di dimezzamento ($t_{1/2} = \ln(2)/k$), secondo la funzione:

$$\begin{aligned} C_t &= C_0 \cdot (1/2)^{t/t_{1/2}} = \\ &= C_0 \cdot \exp(-\ln(2) \cdot t/t_{1/2}) = C_0 \cdot \exp(-kt) \end{aligned}$$

Se t è uguale a $t_{1/2}$, C_t è metà di C_0 . In altre parole, per ogni intervallo di tempo pari all'emivita del farmaco, la sua concentrazione si dimezza. Questo vuole dire che dopo un tempo pari a un'emivita, rimane nel corpo del paziente il 50% della dose somministrata; dopo altrettanto, ne rimane il 25% e così via; dopo 5 emivite del farmaco, è rimasto nel paziente circa il 3% della dose somministrata, cioè una quantità trascurabile. Se la somministrazione viene ripetuta dopo un tempo pari a 5 emivite, la nuova dose semplicemente rimpiazza la precedente (Figura 53.2A). Se invece le nuove somministrazioni vengono fatte a intervalli più brevi, ciascuna di esse andrà a sommarsi a quello che è rimasto delle precedenti (Figura 53.2B).

Durante somministrazioni ripetute, l'andamento della concentrazione plasmatica è dato dalla somma degli andamenti prodotti da ogni dose considerata singolarmente

È importante richiamare ancora una volta il concetto che in generale i processi di distribuzione ed eliminazione implicano cinetiche di I ordine, ovvero in ogni istante le concentrazioni tendono a cambiare di una frazione costante (k). Supponiamo di somministrare 100 mg di farmaco a un paziente che ha ancora in corpo 20 mg

della dose precedentemente somministrata. Il paziente avrà ora 120 mg di farmaco in corpo e ne eliminerà, nell'unità di tempo, $k \cdot 120$ mg, come se eliminasse separatamente $k \cdot 20$ mg della dose vecchia e $k \cdot 100$ mg della nuova. Inoltre, trascorsa un'emivita avrà in corpo 60 mg, dopo due emivite ne avrà ancora 30 e così via; possiamo pensare che abbia ancora 10 mg della vecchia dose e 50 della nuova dopo una emivita, 5 mg della vecchia e 25 della nuova dopo due emivite e così via. In altre parole, la caratteristica di questo tipo di cinetiche è che non fa alcuna differenza considerare separatamente il declino (o il dimezzamento) di ogni singola dose oppure considerare direttamente il declino della quantità complessiva presente nell'organismo. Diviene allora facile predire che cosa succederà delle concentrazioni plasmatiche durante somministrazioni ripetute di farmaci: per ogni dose somministrata possiamo disegnare una curva di concentrazione plasmatica, e l'andamento della concentrazione plasmatica dovuto alla somministrazione ripetuta delle dosi di farmaco si può quindi calcolare semplicemente sommando gli andamenti dovuti a ogni dose considerata singolarmente (Figura 53.3).

Come chiaramente illustrato dalla figura 53.3, se somministriamo ripetutamente *dosi uguali di farmaco a intervalli fissi*, la concentrazione di farmaco cresce con le successive somministrazioni. L'esame della figura ci indica che dopo una fase iniziale sia la sovrapposizione dei singoli andamenti (pannello superiore) che la concentrazione plasmatica totale risultante (pannello inferiore) si stabilizzano su un andamento periodico stabile (*steady state*). Prima di raggiungere la fase di *steady state*, nel pannello superiore si nota la mancanza delle "code" delle somministrazioni precedenti (non vi sono somministrazioni precedenti alla prima) e nel pannello inferiore appare evidente la progressiva salita verso l'oscillazione di *steady state*.

La linea tratteggiata nel pannello inferiore, che rappresenta l'andamento della concentrazione plasmatica molto smussato, evidenzia un aspetto a prima vista curioso: l'andamento della salita verso lo *steady state* è analogo al declino della concentrazione plasmatica a seguito di ogni singola dose, ovvero *la salita verso lo steady state è descritta da un andamento esponenziale con costante di tempo uguale a quella di eliminazione*. Se questo fenomeno può apparire strano, esso risulta forse più comprensibile in base all'osservazione, fatta poco prima, che durante la fase iniziale alla concentrazione plasmatica mancano le "code" di somministrazioni precedenti alla prima, code che hanno andamento esponenziale governato appunto dalla cinetica di eliminazione.

Dopo la prima fase, la concentrazione del farmaco non sale indefinitamente. Ricordando che dopo 5 emivite, ciò che è rimasto di una certa dose è trascurabile, una dose somministrata 5 emivite dopo la prima non fa altro che rimpiazzarla, la successiva rimpiazzerà la seconda e così via. In questo modo la concentrazione plasmatica continuerà a oscillare attorno a un valore che è determinato dalla quantità di farmaco somministrata durante le ultime 5 emivite.

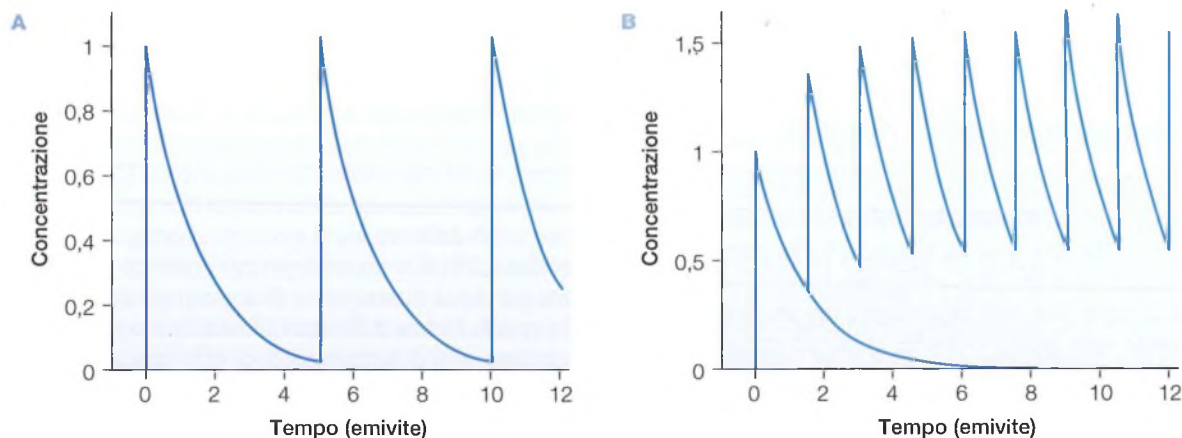


FIGURA 53.2 Somministrazione ripetuta di farmaci. L'unità nell'ascissa è rappresentata dall'emivita di eliminazione. Il pannello **A** mostra come, separando con un intervallo sufficientemente lungo le somministrazioni (5 emivite) non si ha sommazione degli effetti delle dosi successive. Il pannello **B** mostra invece come somministrazioni più ravvicinate diano luogo ad accumulo e a fluttuazioni della concentrazione plasmatica attorno a livelli più alti di quelli raggiunti con la somministrazione singola.

All'inizio di una terapia cronica, la concentrazione plasmatica media sale fino a raggiungere un plateau d'equilibrio, raggiunto il quale ciascuna nuova dose rimpiazza la quantità di farmaco eliminata nell'intervallo trascorso dalla somministrazione precedente

Supponiamo di somministrare 200 mg di farmaco endovena, ottenendo una concentrazione plasmatica di 10 mg/l ($V_d = 20$ l), ogni emivita (Figura 53.4). Al momento della successiva somministrazione (corrispondente al tempo di dimezzamento in questo esempio) la concentrazione plasmatica è scesa a 5 mg/l e la nuova somministrazione la fa salire a 15 mg/l; dopo un'altra emivita questo valore si è dimezzato a 7,5 mg/l e la nuova somministrazione la farà salire a 17,5.

Come si vede nella figura (e come già previsto da quanto detto nel paragrafo precedente), continuando con questo ritmo avremo che dalla quinta somministrazione in poi, la concentrazione plasmatica oscilla stabilmente tra 10 e 20 mg/l. Quindi, da questo momento in poi, ciascuna dose serve solo a rimpiazzare una uguale quantità di farmaco che viene eliminata nell'intervallo di tempo trascorso dalla precedente somministrazione: dopo ogni somministrazione la concentrazione è di 20 mg/l (la quantità di farmaco presente nel paziente è di 400 mg, equivalente a 2 dosi) e si riduce a 10 mg/l dopo un'emivita (si dimezza appunto, come la quantità totale di farmaco che sarà scesa a 200 mg), al momento della nuova somministrazione; quest'ultima riporta la quantità totale a 400 mg e la concentrazione a 20 mg/l. La fase di ascesa è detta *fase d'accumulo*, quella costante è detta *fase di plateau* o di *equilibrio*. Nel corso di una terapia cronica, gli effetti di un farmaco vengono riferiti ai valori di concentrazione plasmatica presenti durante la fase di plateau.

Il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio dipende esclusivamente dall'emivita del farmaco

Come implicito in quanto detto nei paragrafi precedenti, il tempo necessario a raggiungere l'equilibrio non cambia variando la frequenza delle somministrazioni (sempre considerando dosi e intervalli fissi), in quanto dipende solo dal tempo necessario perché la prima dose sia eliminata quasi completamente, e pertanto dal $t_{1/2}$ del farmaco. Questo deve essere tenuto in debito conto dal medico: ad esempio, se un paziente con scompenso cardiaco viene trattato con digitossina (un glicoside cardioattivo) che ha un'emivita di 7 giorni, occorrerà più di 1 mese di trattamento perché la concentrazione plasmatica giunga a plateau; in alternativa, il medico può fare uso di un analogo, la digossina, che ha emivita più breve (circa 1,5 giorni). Vedremo più avanti come sia possibile anche studiare protocolli alternativi basati su una o più dosi iniziali d'attacco o di carico.

Al $t_{1/2}$ è legata non solo la velocità di raggiungimento della fase d'equilibrio, ma anche la velocità con cui la concentrazione plasmatica decade una volta che la terapia viene sospesa (Figura 53.5). Questo aspetto merita attenzione per i farmaci a emivita lunga e dotati di pericolosa tossicità o di finestra terapeutica ristretta.

È importante ricordare come l'emivita di un farmaco sia dovuta ai sistemi di eliminazione presenti nell'organismo e alla loro efficienza. Il medico deve sempre tenere in considerazione la possibilità che fattori individuali o patologie di varia natura (e spesso diverse da quella per cui si imposta il regime terapeutico) possono alterare l'efficienza dei processi di eliminazione del farmaco. Poiché la concentrazione plasmatica che si raggiunge all'equilibrio dipende anch'essa dall'emivita del farmaco (vedi oltre), modificazioni funzionali o patologiche del $t_{1/2}$ possono portare ad aumenti della concentrazione plasmatica (se l'emivita si allunga) e alla possibile comparsa di fenomeni tossici. Anche il contrario può avvenire (ad esempio, in un paziente con insufficienza renale in via di risoluzione); in questo caso non modificare il regime terapeutico, impostato inizialmente tenendo conto di una

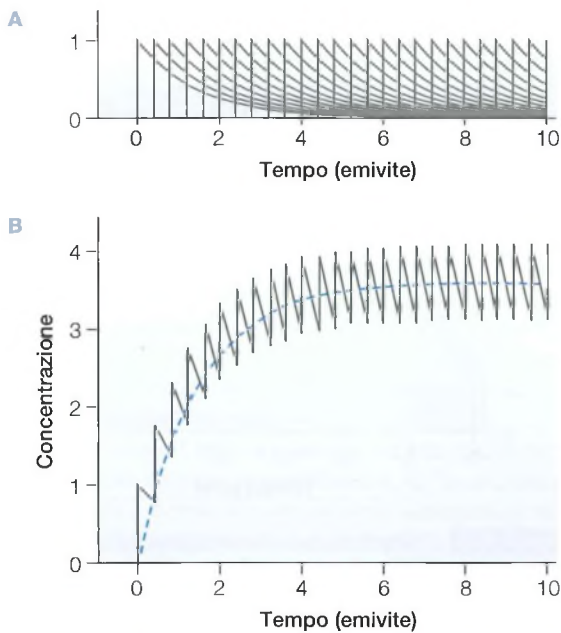


FIGURA 53.3 Rappresentazione schematica del fenomeno di accumulo e raggiungimento dell'equilibrio in seguito a somministrazione ripetuta di farmaci. In entrambi i grafici l'unità di tempo è rappresentata dall'emivita di eliminazione. La **A** mostra, tutte sovrapposte, le concentrazioni plasmatiche che si otterrebbero a seguito della somministrazione di ogni dose del farmaco considerata singolarmente. Ogni dose determina una rapida salita e una discesa monoesponenziale con costante di tempo determinata dal processo di eliminazione del farmaco. Si nota che nella fase tardiva (dopo 5 emivite) il disegno diviene ripetitivo e periodico, mentre nelle fasi iniziali mancano le "code" delle somministrazioni precedenti. In **B** è illustrato l'andamento della concentrazione plasmatica determinata dalla somministrazione ripetitiva del farmaco. Si noti che la fase iniziale è caratterizzata da una salita della concentrazione plasmatica media (linea tratteggiata) verso i valori di equilibrio, mentre la fase tardiva (successiva a 5 emivite dalla prima somministrazione) è caratterizzata da una concentrazione plasmatica media costante attorno a cui oscilla la concentrazione reale. In questa fase, detta di equilibrio di somministrazione, la dose che viene somministrata sostituisce quella che è stata eliminata nell'intervallo tra ciascuna somministrazione. La fase di salita della concentrazione plasmatica media è una curva monoesponenziale caratterizzata dalla stessa costante di tempo del processo di eliminazione.

ridotta efficienza renale, potrebbe causare una riduzione (o la soppressione) dell'efficacia della terapia.

All'equilibrio, la concentrazione plasmatica è funzione della quantità di farmaco somministrata nell'unità di tempo

Per la definizione stessa del termine di equilibrio, una volta superata la fase di accumulo il paziente deve eliminare il farmaco alla stessa velocità alla quale gli viene somministrato. Supponiamo di voler ottenere una concentrazione plasmatica media, all'equilibrio, $(C_p)_{eq}$ (di regola pari alla concentrazione efficace del farmaco): il paziente eliminerà nell'unità di tempo una quantità media di farmaco uguale a $(C_p)_{eq} \cdot Cl$.

Dovremo somministrargli perciò una uguale quantità di farmaco: in particolare, se la clearance è espressa in ml/min e la concentrazione plasmatica in $\mu\text{g/ml}$ ne risulterà la dose da somministrare in $\mu\text{g/min}$ da cui potremo facilmente ricavare i mg/ora o comunque l'unità di misura che preferiamo impiegare. Supponiamo di voler somministrare il farmaco a intervalli di tempo T , avendo cura di esprimere clearance, concentrazione e tempo in unità compatibili, la dose da somministrare sarà:

$$D = (C_p)_{eq} \cdot Cl \cdot T; \text{ ovvero } (C_p)_{eq} = \frac{D}{Cl \cdot T} \quad [6]$$

che descrive la concentrazione media di equilibrio che si ottiene nel plasma somministrando dosi D a intervalli di tempo T .

L'equazione [6] può quindi essere utilizzata per calcolare la dose di farmaco e l'intervallo tra le somministrazioni necessarie per ottenere all'equilibrio la C_p media desiderata, o viceversa per calcolare la concentrazione plasmatica di steady state determinata dalla somministrazione di dosi uguali, D , somministrate a intervalli uguali, T .

Ad esempio, l'agonista α_2 -adrenergico clonidina, usato nel trattamento dell'ipertensione, ha Cl di 3 ml/min/kg ed è efficace a concentrazioni plasmatiche di 1 ng/ml. In un individuo di 70 kg la dose da somministrare per ottenere, dopo 5 emivite, la concentrazione desiderata è di 210 ng/min ($C_e \times Cl = 1 \text{ ng/ml} \times [70 \times 3 \text{ ml/min}]$), ovvero 12,6 μg ogni ora, o 0,3 mg/die. Per farmaci in cui la biodisponibilità è ridotta, il valore calcolato va maggiorato in proporzione.

Utilizzando la definizione di clearance, $Cl = V_d \cdot k_c$ e la relazione $k_c = 0,693 / t_{1/2}$ (vedi Capitolo 51) la [6] può essere riscritta:

$$(C_p)_{eq} = 1,443 \cdot \frac{D}{V_d} \cdot \frac{t_{1/2}}{T} \quad [7]$$

Si noti che il rapporto $t_{1/2} / T$ rappresenta il numero di dosi somministrate nel corso di un'emivita (se $T = t_{1/2}$ abbiamo una somministrazione ogni emivita, in particolare), per cui si può affermare più semplicemente ancora che la concentrazione plasmatica media all'equilibrio durante somministrazioni ripetute è uguale a 1,443 volte la dose totale somministrata nel corso di un'emivita, divisa per il volume di distribuzione apparente.

Sapendo che la clonidina ha V_d di $\approx 3 \text{ l/kg}$ ed emivita di 12 ore, si può utilizzare la [7] per calcolare la C_p d'equilibrio indotta da una terapia cronica con somministrazione di 0,5 mg/die. Per cui:

$$(C_p)_{eq} = 1,443 [500 \mu\text{g} / (3 \cdot 70)] (12 \text{ h} / 24 \text{ h}) = 1,7 \mu\text{g/l.}$$

È ovvio che, per somministrazioni di dosi (D) di valore costante, la quantità somministrata nell'unità di tempo è inversamente proporzionale all'intervallo tra le somministrazioni. Pertanto, se nell'esempio della figura 53.4, la stessa dose D di 100 mg fosse somministrata a intervalli T pari a un terzo di $t_{1/2}$, la quantità somministrata durante ogni emivita (e in generale nel corso della terapia) sarebbe tripla, determinando una concentrazione di

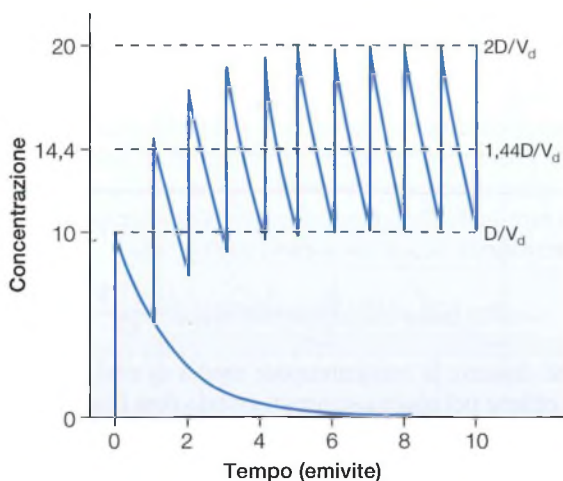


FIGURA 53.4 Aspetti quantitativi della somministrazione ripetitiva di farmaci. Il farmaco è somministrato per via intravascolare a intervalli regolari uguali a un'emivita; a ogni somministrazione vengono dati 100 mg del farmaco il cui volume di distribuzione è di 10 litri. Per semplicità si è assunto l'esempio di un farmaco che ha un'emivita di distribuzione estremamente più piccola di quella di eliminazione. Si osservi che: ogni somministrazione produce un incremento di concentrazione pari al rapporto tra dose e volume di distribuzione, D/V_d , che in questo caso è 100 mg / 10 litri, quindi 10 mg/l; la concentrazione al momento di ogni somministrazione è pari alla metà della concentrazione massima indotta dalla somministrazione precedente; l'equilibrio di somministrazione si raggiunge con concentrazioni che oscillano tra un massimo di 2 volte e un minimo di 1 volta il rapporto tra dose e volume di distribuzione. La concentrazione media all'equilibrio di somministrazione è 1,44 volte il rapporto tra la dose totale somministrata in un'emivita (in questo caso ancora D) e il V_d .

equilibrio tripla. La figura 53.6, che illustra la somministrazione dello stesso farmaco in dosi di pari peso ma con frequenza di somministrazione diversa, mostra che mentre all'aumentare della frequenza di somministrazione sale la concentrazione media, il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio è lo stesso per i tre regimi di somministrazione.

L'importanza dell'equazione [7] sta soprattutto nel fatto che essa stabilisce che la concentrazione plasmatica media (e quindi la quantità media di farmaco presente all'equilibrio nel corpo del paziente) non è funzione solo del valore della singola dose o dell'intervallo di tempo che intercorre tra le dosi, ma è funzione di entrambi e quindi della quantità di farmaco somministrata nell'unità di tempo (o nel corso di un'emivita).

Si ricorda che quantità di farmaco presente nel corpo e concentrazione plasmatica sono due valori perfettamente correlabili tra loro quando la cinetica di distribuzione è molto più rapida di quella di eliminazione. Questo non vale invece se le concentrazioni non sono in equilibrio tra i vari organi e tessuti. In uno dei paragrafi successivi (cinetiche multicompartmentali), verrà discusso in dettaglio l'effetto dei fenomeni di distribuzione sull'andamento delle concentrazioni plasmatiche.

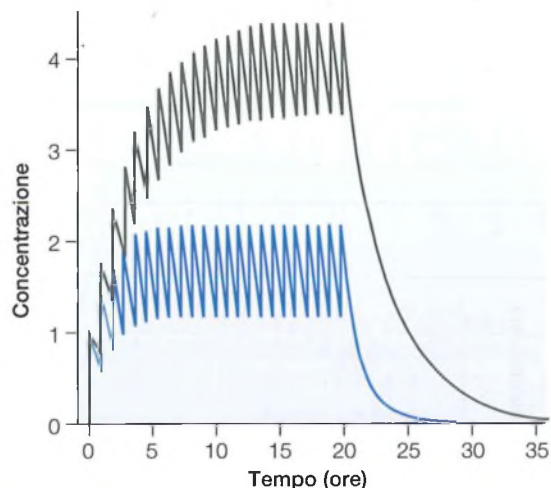


FIGURA 53.5 Effetto di diverse velocità di eliminazione sulle concentrazioni plasmatiche ottenute con la somministrazione ripetitiva di farmaci. Confrontando le due curve si osserva come, per velocità di eliminazione maggiore (linea colorata), lo stesso regime terapeutico comporti: un raggiungimento più rapido dell'equilibrio di somministrazione; un livello medio di concentrazione all'equilibrio più basso; una più rapida caduta a zero dei livelli plasmatici alla sospensione del trattamento. È anche importante notare che l'ampiezza assoluta delle fluttuazioni all'equilibrio non cambia nelle due situazioni essendo essa esclusivamente dipendente dal rapporto dose/volume di distribuzione. Tuttavia, essendo la concentrazione plasmatica media d'equilibrio molto più bassa nel caso di eliminazione accelerata, la stessa dose provoca una maggiore ampiezza percentuale delle fluttuazioni all'equilibrio. Velocità di eliminazione diverse per uno stesso farmaco possono aversi per patologie che alterano i processi di eliminazione.

La dose singola da impiegare si calcola in funzione dell'intervallo tra le somministrazioni

L'equazione [7] può essere riscritta per calcolare, in funzione dell'intervallo tra somministrazioni T , la dose D da somministrare per ottenere, una volta raggiunto l'equilibrio, una concentrazione media C desiderata:

$$D = (C_p)_{eq} \cdot 0,693 \cdot V_d \cdot \frac{T}{t_{1/2}} \quad [8]$$

È sempre importante ricordare il concetto di biodisponibilità, cioè la possibilità che la quantità di farmaco che effettivamente giunge in circolo sia una frazione della dose D somministrata. Nelle equazioni [7] e [8] il termine D indica la quantità di farmaco che effettivamente entra nel corpo del paziente; il termine D va quindi inteso come *dose assorbita*.

Anche se frutto di una serie di assunzioni semplificatorie, l'equazione [8] può essere usata per impostare un protocollo terapeutico in modo razionale. Ad esempio, si vuole somministrare in un paziente di 70 kg l'antiaritmico lidocaina per via endovenosa in modo da raggiungere all'equilibrio la concentrazione plasmatica efficace di 4 mg/l; il volume di distribuzione del farmaco è di 1,1 l/kg e la sua emivita è

di 1,8 ore. Si decide di somministrare il farmaco una volta all'ora; risolvendo l'equazione [8], si ha che:

$$\begin{aligned} D_{ora} &= 0,693 \cdot C \cdot V_d \cdot T/t_{1/2} = \\ &= 0,693 (4 \text{ mg/l})(77 \text{ l}) \frac{1}{1,8} = 118 \text{ mg} \end{aligned}$$

che equivale a circa 2 mg/min (118/60) nel caso si voglia ricorrere a un'infusione continua per fleboclisi. Da notare che questa sarà la dose necessaria perché la concentrazione plasmatica del farmaco sia quella desiderata una volta raggiunto l'equilibrio, cioè dopo circa 9 ore ($5 \times 1,8$ ore). Dosaggio e modalità di applicazione possono variare se si vuole raggiungere la concentrazione desiderata più rapidamente (vedi oltre).

L'equazione [7] può ovviamente servire anche per avere una stima, seppure approssimativa, della concentrazione plasmatica ottenuta in un paziente sottoposto a un dato protocollo terapeutico. Ad esempio, si vuole stimare la concentrazione plasmatica presente in un paziente trattato da più di un mese con il glicoside cardioattivo digossina, somministrato in compresse contenenti 0,2 mg di principio attivo, alla dose di 2 compresse al giorno per os. Le informazioni in possesso (fornite dalla azienda produttrice del medicinale o riportate in diversi testi di Farmacologia Clinica) dicono che la preparazione di digossina ha V_d di 7 l/kg, emivita di 1,7 giorni, e biodisponibilità orale (frazione della dose assorbita per os) di 0,75. Quindi nel paziente in oggetto, il volume di distribuzione è di 490 l ($70 \text{ kg} \times 7 \text{ l/kg}$), la dose giornaliera realmente assorbita è 0,3 mg ($2 \times 0,2 \text{ mg} \times 0,75$); essendo la quantità di farmaco presente nel corpo del paziente all'equilibrio pari a 1,443 volte la dose somministrata in un tempo equivalente a una emivita (equazione [7]), tale valore è 0,736 mg ($1,443 \times 0,3 \text{ mg} \times 1,7$), cioè 736 μg (microgrammi). Dividendo per il volume di distribuzione abbiamo la concentrazione plasmatica:

$$C = 736 \mu\text{g} / 490 \text{ l} = 1,5 \mu\text{g/l}$$

L'intervallo fra le somministrazioni influenza l'entità delle oscillazioni della concentrazione plasmatica all'equilibrio

Il rapporto tra concentrazione massima e minima all'equilibrio è strettamente dipendente dall'intervallo di somministrazione, come si può chiaramente apprezzare dal confronto delle curve tracciate nella figura 53.6: quanto più ravvicinate sono le somministrazioni tanto più piccole sono le oscillazioni della concentrazione all'equilibrio. Di conseguenza, se si vuole mantenere costante la concentrazione del farmaco occorrerà somministrare il farmaco in continuo, ad esempio mediante fleboclisi. Se, per motivi pratici, le somministrazioni devono essere intervallate, occorre suddividere in diverse frazioni nell'arco della giornata la dose giornaliera calcolata con l'equazione [8], ricordando che minore è l'intervallo fra le somministrazioni, minore è l'entità delle fluttuazioni della C_p all'equilibrio. Questo aspetto è di importanza cruciale per farmaci con basso indice terapeutico, cioè farmaci capaci di produrre effetti tossici a concentrazioni

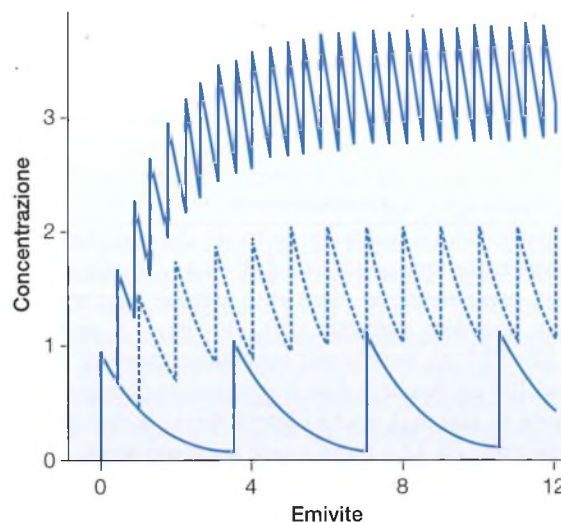


FIGURA 53.6 Effetto di somministrazioni più ravvicinate sull'andamento delle concentrazioni plasmatiche. Confrontando le varie curve si osserva come, ravvicinando le somministrazioni dello stesso farmaco, si ottengano concentrazioni plasmatiche medie all'equilibrio di somministrazione più alte e non cambi il tempo per raggiungere l'equilibrio. Mentre l'entità assoluta delle fluttuazioni (massimo-minimo) della concentrazione plasmatica non cambia essendo dovuta esclusivamente al rapporto tra dose e volume di distribuzione, le fluttuazioni percentuali (fluttuazione/concentrazione media) dei livelli plasmatici all'equilibrio sono più contenute ravvicinando le somministrazioni.

di poco superiori a quelle necessarie per produrre effetti terapeutici.

Il parametro principale da considerare a questo fine è l'ampiezza in percentuale delle fluttuazioni che possiamo accettare nella concentrazione del farmaco.

La somministrazione di una dose durante un protocollo di somministrazioni ripetute di farmaco, una volta raggiunto l'equilibrio, sposta la concentrazione plasmatica dal suo valore minimo di fluttuazione a quello massimo. Pertanto l'ampiezza delle fluttuazioni all'equilibrio è semplicemente data dal rapporto D/V_d . Se confrontiamo questo valore con la concentrazione di equilibrio data dall'equazione [7], $C_{eq} = (D/V_d) \cdot 1,443 \cdot (t_{1/2}/T)$, vediamo che la fluttuazione percentuale è $(D/V_d)/C_{eq} = T/(1,443 \cdot t_{1/2})$.

Una volta stabilito che consideriamo accettabile una fluttuazione non superiore a una certa percentuale P , occorrerà che $T/(1,443 \cdot t_{1/2}) < P$, e $T < (1,443 \cdot P) \cdot t_{1/2}$: per contenere le fluttuazioni entro il 50% l'intervallo di somministrazione dovrà essere inferiore a $1,443 \cdot 0,5 = 0,72 \cdot t_{1/2}$ poco meno di una emivita. Analogamente, occorreranno circa tre somministrazioni ogni emivita per avere fluttuazioni attorno al 20% ($1,443 \cdot 0,2 = 0,29 \cdot t_{1/2}$) e sette ogni emivita ($T = 0,14 \cdot t_{1/2}$) per ridurre le fluttuazioni al 10%.

Proviamo ora a calcolare di quanto varierà la concentrazione plasmatica della digossina dell'esempio riportato poco sopra (200 mg ogni 12 ore per un V_d di 490 litri e un'emivita di 41 ore, e una frazione assorbita del 75%).

La concentrazione plasmatica media all'equilibrio è, come visto sopra, 1,5 mg/litro e fluttuerà di una quantità (Frazione assorbita) $\times D / V_d = 0,75 \cdot 200/490 = 0,3 \mu\text{g/l}$, ovvero tra 1,65 e 1,35 $\mu\text{g/l}$, pari a una fluttuazione percentuale di $100 \cdot 0,3/1,65 = 18\%$ circa. Volendo ridurre al 10% le fluttuazioni, occorrerà cambiare posologia e intervallo tra le somministrazioni.

In particolare, si dovrà fare in modo che ogni dose porti la concentrazione plasmatica da 0,95 a 1,05 volte il valore della concentrazione plasmatica media; ciò corrisponde a una dose assorbita $(C_p)_{eq} \cdot V_d / 10 = 1,5 \mu\text{g/l} \times 490 / 10 = 73,5 \mu\text{g}$, ovvero alla somministrazione di dosi di circa 100 μg . Poiché la dose singola risulta dimezzata (100 invece di 200 mg), anche l'intervallo tra le dosi si dovrà dimezzare, da 12 a 6 ore (come suggerito sopra, circa 7 somministrazioni ogni emivita).

Le cinetiche di assorbimento influenzano l'entità delle oscillazioni della concentrazione plasmatica durante la fase d'equilibrio

Tutte le osservazioni svolte fin qui valgono, in buona approssimazione, per somministrazioni attraverso vie in cui l'assorbimento è praticamente istantaneo (vie intravascolari). Nel caso in cui l'assorbimento proceda più lentamente, la fase di salita della concentrazione plasmatica susseguente a ogni singola somministrazione è meno veloce e i picchi di concentrazione sono meno prominenti (Figura 53.1). Da notare come i valori di concentrazione media a plateau nei tre casi illustrati nella figura 53.7 non siano sostanzialmente diversi fra loro, ma come siano diversi i valori massimi e minimi.

Questa differenza può essere convenientemente sfruttata quando il farmaco abbia una finestra terapeutica ristretta; il fatto che le fluttuazioni siano più smussate con la somministrazione orale evita che la concentrazione plasmatica raggiunga i livelli a cui possono comparire gli effetti tossici.

Un fatto curioso si realizza quando la velocità di assorbimento è particolarmente bassa (come nel caso di preparazioni "ritardo", vedi Capitolo 50), e in particolare quando la velocità di assorbimento diviene minore di quella di eliminazione. Esaminando l'equazione [2] si osserva che in questo caso, poiché:

$$\tau_a > \tau_e, \exp(-t / \tau_a) > \exp(-t / \tau_e),$$

sia il numeratore che il denominatore cambiano segno e otteniamo la seguente equazione per la concentrazione plasmatica:

$$C_p(t) = \frac{D}{Cl} \cdot \frac{\exp(-t/\tau_a) - \exp(-t/\tau_e)}{\tau_a - \tau_e}$$

che risulta identica all'equazione [2] salvo che τ_a e τ_e si sono scambiate. Ciò significa che se l'assorbimento è più lento della eliminazione, la concentrazione plasmatica, a seguito di una singola somministrazione, avrà una fase di salita governata dalla emivita di eliminazione e una di discesa governata dalla costante di assorbimento. Per un certo verso questo non è poi così strano: se consideriamo un assorbimento molto lento come qualcosa di

analogo a somministrazioni ripetute in vena, sappiamo che la concentrazione plasmatica raggiunge il suo livello di plateau con una cinetica dipendente dalla velocità di eliminazione (raggiunge il plateau dopo 5 emivite di eliminazione).

Poiché nel caso di assorbimento molto lento le velocità di assorbimento ed eliminazione scambiano il loro ruolo nel determinare la forma della curva di concentrazione plasmatica, nel caso di somministrazioni ripetute la concentrazione tenderà al plateau con cinetica dominata dalla velocità di assorbimento e alla sospensione del trattamento scenderà a zero con la stessa cinetica (mentre normalmente è la velocità di eliminazione a governare sia la salita a plateau che la discesa a fine trattamento). In questo caso la velocità di eliminazione influisce solo sulla forma delle oscillazioni, che saranno tanto meno marcate quanto più lenta è l'eliminazione (il ruolo normalmente giocato dalla velocità di assorbimento, quando essa è maggiore della velocità di eliminazione).

Dosi d'accumulo per raggiungere rapidamente l'equilibrio

Abbiamo visto che il raggiungimento della fase di plateau richiede un tempo pari a 5 emivite di eliminazione del farmaco. Nella maggior parte dei casi, il $t_{1/2}$ dei farmaci ha un valore di qualche ora, ma per alcuni esso può essere dell'ordine di giorni. Per quei farmaci a emivita particolarmente lunga e per i quali sia necessario raggiungere rapidamente la concentrazione terapeutica (C_{eff}), come ad esempio i farmaci inotropo-positivi nello scompenso cardiaco, né il medico né il paziente possono attendere le settimane necessarie per il raggiungimento dell'equilibrio. Il medico ha di fronte a sé due possibilità: utilizzare un farmaco con uguale meccanismo d'azione ma con farmacocinetica più favorevole, oppure somministrare in poco tempo una o più dosi d'accumulo di dimensioni tali da consentire alla concentrazione plasmatica di salire subito al valore di C_{eff} .

La dose necessaria per ottenere rapidamente la C_{eff} è detta dose d'accumulo, D_{acc} , ed è data da:

$$D_{acc} = C_{eff} \cdot V_d \quad [13]$$

Questa dose (eventualmente corretta in funzione della biodisponibilità) può essere somministrata in un unico bolo o in dosi frazionate e somministrate a intervalli relativamente ristretti.

I protocolli terapeutici utilizzati per somministrare le dosi d'accumulo tengono conto dell'entità e del grado di pericolo dei fenomeni tossici che possono insorgere a seguito dell'alta concentrazione plasmatica indotta dalla dose d'accumulo. Infatti, il volume occupato dal farmaco durante la fase di distribuzione che segue all'assorbimento può essere anche di molto inferiore al valore finale di V_d , e la concentrazione plasmatica che ne risulta può persistere a livelli tossici anche per diverse ore. È possibile calcolare la dose d'accumulo anche in funzione della dose di mantenimento che si vuole utilizzare; quest'ultima è infatti pari a

$$D = 0,693 \cdot V_d \cdot C_{eff} \cdot T/t_{1/2} \text{ (equazione [8])}$$

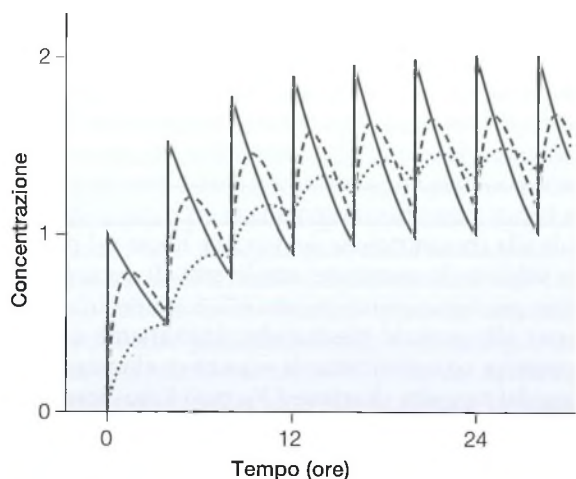


FIGURA 53.7 Effetto di diverse velocità di assorbimento sull'andamento delle concentrazioni plasmatiche, a parità di velocità di eliminazione. Confrontando le diverse curve si osserva come, per velocità di assorbimento più lente (curva tratteggiata e curva punteggiata), le fluttuazioni dei livelli plasmatici all'equilibrio di somministrazione risultino smussate e più limitate; sono invece indipendenti dalla velocità di assorbimento sia il tempo necessario a raggiungere l'equilibrio (che dipende solo dalla costante di eliminazione e perciò dall'emivita) che la concentrazione plasmatica media; quest'ultimo valore è dato dalla quantità di farmaco assorbita nel corso di un'emivita (indipendentemente dalla velocità di assorbimento) moltiplicato per $1,44/V_d$.

dove T è l'intervallo tra dosi di mantenimento); sostituendo il prodotto $V_d \cdot C$ con D_{acc} (equazione [13]) abbiamo la seguente relazione:

$$D = 0,693 \cdot D_{acc} \cdot \frac{T}{t_{1/2}} \quad [14]$$

ovvero:

$$D_{acc} = 1,443 \cdot D \cdot t_{1/2} / T$$

Quindi la dose d'accumulo è pari a 1,443 volte la dose somministrata in un tempo pari a una emivita del farmaco. Ad esempio, per la digitossina (emivita 7 giorni) somministrata alla dose di 0,1 mg al dì, la dose d'accumulo è di $1,443 \times 0,1 \text{ mg} \times 7 \approx 1 \text{ mg}$.

Cinetiche di equilibrio tra più compartimenti

È spesso importante essere in grado di valutare la concentrazione del farmaco in un particolare organo o tessuto. Come già visto nel Capitolo 51, ciascun organo (compartimento) può essere dotato di una sua specifica avidità (affinità) per il farmaco: quindi la quantità di farmaco presente in un dato compartimento all'equilibrio di distribuzione dipende dall'avidità e dal volume del compartimento stesso. Se visto come equivalente a un certo volume di plasma, possiamo dire che ciascun compartimento è dotato di un suo V_d e che il V_d totale dell'individuo è dato dalla somma dei singoli V_d di ciascun compartimento.

Considerando più di un compartimento, due aspetti vanno distinti: il rapporto di concentrazione del farmaco nei due compartimenti all'equilibrio e la velocità con cui le concentrazioni tendono all'equilibrio.

La concentrazione all'equilibrio può essere diversa in tessuti diversi

Se si considerano due compartimenti idrici, le concentrazioni dovranno essere ovviamente uguali all'equilibrio; se però il farmaco tende a legarsi o concentrarsi in particolari strutture (proteine nel plasma, fase acquosa oppure fase lipidica del tessuto) le concentrazioni totali saranno diverse, all'equilibrio, nei due compartimenti. Ci viene in aiuto il concetto di volume apparente (vedi Capitolo 51, Box 2): per volumi apparenti dei due compartimenti V_{d1} e V_{d2} , all'equilibrio le concentrazioni nella fase acquosa saranno uguali (diciamo C) e i due compartimenti conterranno quantità di farmaco pari a $Q_1 = V_{d1} \cdot C$ e $Q_2 = V_{d2} \cdot C$, rispettivamente. Consideriamo come indice della tendenza del farmaco ad accumularsi in un particolare tessuto il rapporto tra volume apparente e volume reale del tessuto ($k_p = V_d / V$). Avremo quindi una concentrazione finale nel primo compartimento pari a:

$$C_1 = Q_1 / V_1 = (V_{d1} / V_1) C = k_{p1} \cdot C$$

e nel secondo compartimento pari a:

$$C_2 = Q_2 / V_2 = (V_{d2} / V_2) C = k_{p2} \cdot C,$$

e un rapporto di concentrazione all'equilibrio tra i due compartimenti uguale a k_{p1} / k_{p2} .

La velocità con cui un compartimento tessutale si equilibra con il plasma dipende da flusso plasmatico e V_d

La velocità con cui i due compartimenti si equilibrano è data dal rapporto tra flusso del farmaco (quantità che si sposta nell'unità di tempo) e quantità di farmaco che si deve spostare. Questo è in accordo con la definizione della costante di velocità, k , come riduzione frazionaria (della distanza dall'equilibrio) nell'unità di tempo. Nella pratica, uno dei due compartimenti è sempre rappresentato dal plasma, in quanto è con questo che la componente tessutale del secondo compartimento si equilibra. Per poter valutare la velocità con cui si instaura l'equilibrio tra plasma e un dato compartimento, occorre per prima cosa considerare che la concentrazione del farmaco libero nel plasma venoso è uguale alla concentrazione nella fase acquosa del tessuto (C_T) mentre la concentrazione del farmaco libero nel plasma arterioso è uguale al prodotto $C_a \cdot F$, dove C_a indica la concentrazione plasmatica (arteriosa) e F la quota libera del farmaco (frazione non legata alle proteine plasmatiche).

Durante il passaggio nel letto capillare del tessuto, la concentrazione del farmaco libero nel plasma si equilibra con il tessuto, passando da $C_a \cdot F$ a C_T . Poiché nel plasma quota libera e legata si equilibrano, la concentrazione totale (farmaco libero + legato) passa da C_a a C_T / F . Pertanto la quantità di farmaco lasciata dal sangue al tessuto nell'unità di tempo (flusso del farmaco) è $(C_a - C_T / F) \times \Phi$, dove

Φ indica il flusso plasmatico in direzione del tessuto. La quantità di farmaco totale che deve essere trasferita dal sangue al tessuto è data in prima approssimazione dal prodotto volume apparente del tessuto \times differenza di concentrazione tra sangue arterioso e sangue in equilibrio con il tessuto. La quantità totale da trasferire è quindi uguale a $V_T (C_a - C_T / F)$. La velocità con cui si va all'equilibrio, rapporto tra quantità trasferita nell'unità di tempo e quantità totale da trasferire, è quindi data dal rapporto Φ / V_T .

Si tenga presente che se esistono barriere che ostacolano la diffusione del farmaco al tessuto, la velocità di equilibrio sarà più lenta, essendo limitata dalla presenza delle barriere e non dal flusso ematico.

La velocità con cui un compartimento tissutale si equilibra con il plasma dipende dal legame del farmaco alle proteine plasmatiche

Da queste considerazioni si deduce che ogni compartimento si equilibra con il plasma con velocità che è uguale al rapporto tra il flusso plasmatico al tessuto stesso e il volume apparente di distribuzione del compartimento. Si noti che un alto legame alle proteine plasmatiche comporta bassi volumi apparenti di distribuzione e perciò più rapido equilibrio dei vari compartimenti. Come già sottolineato, il compartimento può equilibrarsi più lentamente di quanto previsto da questa relazione, qualora le membrane cellulari interposte alla diffusione del farmaco al tessuto divengano fattore limitante del trasferimento di farmaco; in tal caso il sangue non fa in tempo, nel letto capillare, a equilibrarsi con il tessuto, e la velocità di distribuzione al tessuto è governata dalla diffusione attraverso la barriera.

Questa derivazione, seppure approssimata, sottolinea l'utilità operativa del concetto di volume apparente di distribuzione, e l'opportunità della sua definizione come rapporto tra quantità di farmaco somministrata e concentrazione plasmatica totale (piuttosto che concentrazione del farmaco libero nel plasma) ottenuta; infatti con questa definizione la relazione tra volume apparente di distribuzione e velocità di distribuzione risulta semplice e diretta. La rilevanza cinetica del legame alle proteine plasmatiche è però più complessa. Un elevato legame può comportare notevoli rallentamenti di tutte le cinetiche; infatti, se l'affinità del legame farmaco-proteina è molto alta, la dissociazione del complesso può essere molto lenta. In questo caso la sola quota libera ha tempo di equilibrarsi a livello capillare e il flusso del farmaco è solo: $(C_a \cdot F - C_T) \Phi$, ovvero è una frazione F di quanto previsto sopra. Per un legame del 99%, $F = 0,01$, il flusso del farmaco potrebbe ridursi di 100 volte con un considerevole rallentamento delle cinetiche.

Il caso particolare del nefrone

Il concetto di equilibrio fra più compartimenti può essere applicato anche tra nefrone e plasma. In realtà, qui la situazione è diversa. Infatti il principale meccanismo di trasferimento del farmaco dal compartimento plasmatico al nefrone è il passaggio insieme all'acqua plasmatica nel corso della filtrazione glomerulare; pertanto la quantità

di farmaco che lascia il plasma durante la filtrazione non è proporzionale alla concentrazione plasmatica totale ma solo alla concentrazione della quota libera del farmaco (non legata alle proteine plasmatiche). Sia che il farmaco filtrato venga tutto escreto, sia che venga in parte riassorbito passivamente o attivamente, la quantità di farmaco escreta sarà comunque anch'essa proporzionale alla concentrazione del farmaco libero nel plasma. La velocità di escrezione renale sarà di conseguenza tanto più bassa quanto più alta è la frazione di farmaco legata alle proteine plasmatiche. Incontriamo qui una apparente contraddizione: la velocità di eliminazione è data dal rapporto clearance / V_d , però l'alto legame alle proteine plasmatiche, pur riducendo il volume apparente di distribuzione, rallenta la cinetica di passaggio sangue/urine (eliminazione). Ciò è dovuto al fatto che la clearance renale del farmaco è ancor più ridotta, dal legame alle proteine plasmatiche, di quanto lo sia il V_d : infatti la clearance è proporzionale alla frazione libera del farmaco (libero/totale), mentre il V_d è inversamente proporzionale alla concentrazione plasmatica totale.

In presenza di attiva secrezione tubulare, la concentrazione del farmaco libero si riduce a mano a mano che esso viene attivamente escreto, e il farmaco eventualmente legato alle proteine plasmatiche si dissocia mantenendo l'equilibrio tra concentrazione libera e legata. In questo caso, se la dissociazione dalle proteine è molto rapida, il flusso di farmaco è proporzionale alla concentrazione plasmatica totale, la clearance è poco sensibile al legame alle proteine plasmatiche, e si ricade nel caso generale trattato più sopra, dove velocità del processo (eliminazione renale in questo caso) e volume di distribuzione del farmaco sono inversamente proporzionali.

Un altro caso nel quale il legame alle proteine plasmatiche comporta rallentamento dei processi di distribuzione si verifica a livello placentare; qui le cinetiche di equilibrio sono lente a causa del basso flusso ematico materno rispetto al volume di distribuzione apparente del feto. Per farmaci altamente legati alle proteine plasmatiche, le proteine plasmatiche fetali agiscono da serbatoio di accumulo innalzando significativamente il volume apparente fetale e, di conseguenza, le cinetiche di equilibrio transplacentare risultano marcatamente rallentate.

I farmaci possono ridistribuirsi tra compartimenti diversi

Organi molto perfusi (con alto flusso ematico per unità di volume) tendono a equilibrarsi molto rapidamente con il plasma. Organi poco perfusi, e in particolare con alto volume apparente (come è il caso del tessuto adiposo per farmaci lipofili) si equilibrano con estrema lentezza. Consideriamo l'andamento delle concentrazioni di un farmaco molto lipofilo, come il diazepam (una benzodiazepina ansiolitica) o il tiopental (un barbiturico ipnotico, il "siero della verità") nel plasma e nel SNC, a seguito di una somministrazione endovenosa. Passando agevolmente la barriera ematoencefalica, il farmaco si distribuisce rapidamente nel SNC. In particolare, poiché il flusso ematico cerebrale è molto più elevato di quello

di altri organi e tessuti, il SNC si equilibra ben prima che significative quantità di farmaco abbiano avuto il tempo di diffondere ed equilibrarsi negli altri tessuti; in altre parole, nelle prime decine di secondi dopo la somministrazione endovenosa del farmaco, il volume di distribuzione apparente del farmaco è virtualmente limitato a plasma, tessuto cerebrale, fegato e pochi altri organi con piccolo V_d , e concentrazioni efficaci si raggiungono molto rapidamente. A mano a mano che il farmaco si equilibra anche negli altri tessuti (il volume di distribuzione apparente aumenta), la concentrazione plasmatica scende e, di conseguenza, anche la concentrazione cerebrale, in rapido equilibrio, si riduce e può scendere sotto i livelli efficaci. In questo caso, l'effetto del farmaco si esaurisce, e il farmaco può pertanto mostrare una brevissima durata d'azione, non legata a una sua rapida metabolizzazione o eliminazione, bensì alla sua ridistribuzione. Se alla fine della fase di ridistribuzione, la concentrazione del farmaco nel SNC non è scesa sotto i livelli efficaci, l'azione terminerà solo quando la concentrazione sarà scesa ulteriormente, grazie a metabolismo ed escrezione; in questo caso la durata d'azione sarà determinata dalla emivita del farmaco, e non più dalla velocità della ridistribuzione.

La figura 53.8 mostra un esempio di andamento delle concentrazioni cerebrale, plasmatica e muscolare di tiopentale, simulato dal calcolatore per una dose di 100 mg. Si può notare come la velocità di ridistribuzione (variazioni iniziali) sia di gran lunga superiore alla velocità di eliminazione (declino nella seconda fase). Questo aspetto è particolarmente importante per farmaci molto liposolubili, come quelli che stiamo descrivendo, perché essi hanno in genere un volume di distribuzione apparente (all'equilibrio) molto elevato, in quanto tendono a distribuirsi in larga misura alle masse muscolari e a concentrarsi nei depositi adiposi; come si è visto, la costante di eliminazione è determinata dal rapporto $clearance/V_d$ e quindi, per quanto attivo sia il metabolismo di questi farmaci (che in quanto lipofili non vengono praticamente escreti come tali a livello renale) e alta la loro clearance metabolica, essi tendono ad avere basse costanti di eliminazione e lunghe emivite. Ci troveremo di fronte pertanto al paradosso che diazepam e tiopentale, che mostrano una durata d'azione di pochi minuti dopo una singola somministrazione endovenosa a bassa dose, rivelano una lunghissima durata d'azione se somministrati a dosi più elevate o se le somministrazioni vengono ripetute fino a saturare i tessuti.

La distribuzione dei farmaci somministrati per inalazione

La somministrazione di gas per inalazione, in particolare gli anestetici generali, è caratterizzata da alcuni aspetti specifici di notevole interesse. Infatti, l'assorbimento avviene a livello alveolare polmonare e molti di questi farmaci non vengono praticamente metabolizzati o escreti per via diversa dalla eliminazione polmonare: assorbimento ed eliminazione avvengono cioè nella stessa sede e il livello di plateau che viene raggiunto costituisce

realmente una situazione di equilibrio, nella quale in ogni istante esce tanto farmaco quanto ne entra. In tale situazione di equilibrio il rapporto tra concentrazione plasmatica e concentrazione alveolare del gas non è altro che la solubilità del gas nel plasma, in quanto la solubilità di un gas è propriamente definita come rapporto tra concentrazione di un gas nella fase liquida e concentrazione nella fase gassosa all'equilibrio.

Operativamente, è più comodo parlare di pressione parziale di un gas piuttosto che di sua concentrazione in fase gassosa. La concentrazione del gas è n/V e, secondo la legge dei gas ideali, $pV = nRT$, dove p , V , n e T indicano rispettivamente pressione, volume, numero di moli e temperatura assoluta, ed R è la costante dei gas (62 l mmHg per mole per grado Kelvin); pertanto la pressione parziale di un gas a concentrazione C è $P = R \cdot T \cdot C$. Questa relazione vale sia per i gas che per i liquidi volatili allo stato di vapore, con l'unica limitazione che la pressione parziale di un vapore non può superare, per definizione, la sua pressione di vapore (pressione alla quale il vapore è in equilibrio con lo stato liquido). Pertanto un anestetico volatile è utilizzabile solo se sufficientemente potente o abbastanza volatile da poter esercitare azione anestetica a una pressione parziale nell'aria inspirata inferiore alla sua pressione di vapore a temperatura ambiente. Ad esempio, l'etere è agevolmente utilizzabile perché ha pressione di vapore di 442 mmHg a 20 °C e la pressione parziale necessaria per ottenere anestesia chirurgica è di soli 25 mmHg. All'equilibrio, la concentrazione degli anestetici a livello cerebrale è ragionevolmente vicina a quella plasmatica. Per ogni anestetico, è necessario raggiungere determinati valori di concentrazione plasmatica per produrre i vari stadi dell'anestesia: si può definire la concentrazione efficace dell'anestetico (C_{eff}) quella concentrazione plasmatica necessaria per produrre anestesia chirurgica. La potenza dell'anestetico è tanto più alta quanto minore è la C_{eff} . Date le diverse caratteristiche di solubilità dei vari anestetici, la potenza può non essere strettamente legata alla concentrazione effettiva alveolare (e alla pressione parziale). All'equilibrio, la pressione parziale dell'anestetico a livello alveolare è uguale a quella nell'aria inspirata; se tale pressione è in equilibrio con una concentrazione plasmatica uguale alla C_{eff} si ottiene un adeguato grado di anestesia in sicurezza. Tale concentrazione del gas nell'aria inspirata viene definita pertanto *concentrazione di sicurezza di gas anestetico*.

La concentrazione dell'anestetico nel sangue si equilibra con la concentrazione alveolare seguendo una cinetica di I ordine. Schematicamente, poiché i gas anestetici sono tutti molecole piccole e liposolubili, essi si equilibrano rapidamente tra aria alveolare e sangue polmonare; essi diffondono anche rapidamente a tutti i tessuti, in un volume di distribuzione di circa 42 litri (acqua corporea totale) per un soggetto adulto medio di 70 kg. Poiché il flusso polmonare è uguale alla gittata cardiaca (5 l/min), se potessimo mantenere la concentrazione di sicurezza di gas fissa a livello alveolare, la costante di tempo per equilibrare la concentrazione plasmatica e portarla alla C_{eff} sarebbe di V_d / flusso , cioè ~8 min. Questo implica che

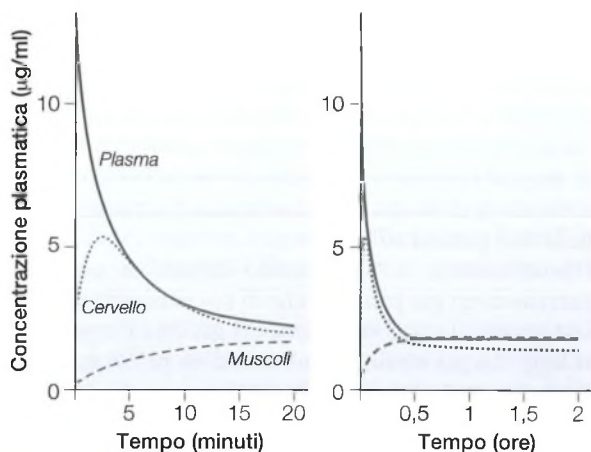


FIGURA 53.8 Andamento, simulato al computer, delle concentrazioni plasmatica e tissutale (a livello cerebrale e muscolare) a seguito di somministrazione di 100 mg di tiopentale in vena in un soggetto di 70 kg. Si noti come la concentrazione cerebrale si equilibra rapidamente con quella plasmatica (grafico di sinistra dove la scala dei tempi è in minuti) e come entrambe decadano rapidamente nei primi 10-20 minuti (fase di ridistribuzione); mentre la curva della concentrazione muscolare del farmaco è ancora nella fase di salita, quelle plasmatica e cerebrale si stabilizzano e scendono lentamente; solo più tardi le concentrazioni nei tre distretti viaggiano parallelamente (grafico di destra, notare la diversa scala temporale qui espressa in ore) e decadono molto lentamente come previsto dalla clearance molto bassa del farmaco. L'effetto a livello cerebrale si istaura rapidamente e risulta di breve durata; il suo esaurimento non è dovuto a eliminazione, ma a ridistribuzione del farmaco ad altri tessuti.

il 90% dell'equilibrio viene raggiunto in circa 20 minuti. La concentrazione dell'anestetico a livello alveolare non raggiunge però subito la concentrazione di sicurezza. A ogni atto respiratorio, circa 0,3 litri di aria raggiungono gli alveoli, contro un volume totale polmonare durante l'inspirazione di circa 2,8 l (capacità funzionale residua + volume telerespiratorio + volume inspiratorio), per cui al primo atto respiratorio si raggiunge solo una concentrazione di $0,3/2,8 = 0,11$ volte la concentrazione di sicurezza. Parte del gas arrivato agli alveoli viene sottratto dal sangue e pertanto la concentrazione alveolare dopo il secondo atto respiratorio è ancora molto inferiore alla concentrazione di sicurezza. In generale si tende a raggiungere una situazione nella quale ogni atto respiratorio restituisce agli alveoli la stessa quantità di anestetico che il sangue sottrae. Questo pseudoequilibrio si ottiene dopo approssimativamente 2 minuti (periodo di *washout* o lavaggio polmonare). Se la solubilità del gas è molto bassa, il sangue ne sottrae una frazione molto bassa; la concentrazione alveolare sale quindi rapidamente e dopo il periodo di *washout* avrà già praticamente raggiunto la concentrazione di sicurezza. In questo caso la situazione è simile a quella teorica descritta sopra e la C_{eff} viene raggiunta in poco più di 20 min. Se viceversa il gas ha solubilità molto alta quasi tutto il gas che entra a ogni atto respiratorio viene sottratto dal sangue e si diffonde a tutto il corpo e, di conseguenza, allo pseudoequilibrio che segue il periodo di *washout*, la concentrazione alveolare sarà di poco superiore all'iniziale

$0,11 \times [\text{concentrazione di sicurezza}]$. La concentrazione alveolare comincia a salire solo a mano a mano che anche la concentrazione plasmatica si innalza, riducendo la frazione sottratta dal sangue a ogni atto respiratorio. In pratica, è come se tutti i liquidi corporei dovessero equilibrarsi con una concentrazione alveolare dell'ordine di $1/9$ della concentrazione di sicurezza, ovvero con una cinetica 9 volte più lenta (almeno inizialmente) di quella discussa sopra per la situazione ideale; in questo caso l'equilibrio alla C_{eff} si raggiungerà solo dopo più di un'ora. In realtà, dato il carattere intermittente della respirazione, per anestetici con solubilità elevatissime, gli alveoli non conterranno concentrazioni significative di gas per buona parte del ciclo respiratorio: la concentrazione alveolare media potrà essere quindi ancora più bassa e la lentezza del processo di equilibrio ancora maggiore.

Nel caso di gas a bassa solubilità, il fattore limitante la velocità del processo è la sottrazione di gas da parte del sangue, e il processo si potrà accelerare aumentando la gittata cardiaca ma non l'attività respiratoria. Per gas ad alta solubilità, viceversa, il fattore limitante è l'arrivo di gas agli alveoli, e il processo si potrà pertanto accelerare aumentando la frequenza o la profondità della respirazione ma non la gittata cardiaca (il sangue sottrae già quasi tutto il gas che c'è). Per gas con solubilità intermedia, varia l'importanza relativa di gittata e attività respiratoria; in normali condizioni fisiologiche di ventilazione e gittata i due fattori sono ugualmente importanti per valori di solubilità dell'ordine di 1,2.

Da quanto detto, la velocità del processo di equilibrio non dovrebbe dipendere dalla concentrazione del gas anestetico; quando la concentrazione del gas è molto elevata, invece, il processo risulta più rapido, soprattutto per i gas ad alta solubilità. Questo fenomeno, detto *effetto concentrazione*, è spiegabile sulla base del fatto che un volume maggiore della miscela anestetica verrà inspirato per rimpiazzare il gas anestetico assorbito in grossa quantità; lo stesso fenomeno si verifica a carico di altri anestetici somministrati contemporaneamente (*effetto secondo gas*): se un agente come l'alotano viene impiegato in bassa concentrazione in associazione a protossido d'azoto in alta concentrazione, anch'esso si equilibrerà più rapidamente grazie all'aumento dell'influsso di miscela gassosa per rimpiazzare il protossido che viene assorbito.

Tutte le osservazioni svolte fin qui valgono anche per l'eliminazione degli anestetici alla sospensione della somministrazione: gas a bassa solubilità vengono eliminati piuttosto rapidamente perché il sangue polmonare si "purifica" quasi completamente, mentre i gas a elevata solubilità vengono eliminati molto più lentamente, e l'aumento della ventilazione può accelerare il processo. Si noti che la potenza di un gas anestetico, intesa come C_{eff} , non ha niente a che fare con la velocità di distribuzione, che è unicamente determinata dalla solubilità. Si genera talvolta confusione su questo argomento a causa del fuorviante utilizzo del termine potenza per intendere la concentrazione alveolare efficace: in questa accezione vi sarebbe una relazione diretta tra potenza e solubilità (e caratteristiche cinetiche), in quanto un farmaco ad alta

solubilità richiede concentrazioni alveolari più basse. Di una certa importanza è invece la potenza di un gas anestetico quando essa è tale da necessitare somministrazioni a concentrazione molto elevate per ottenere anestesia: in questo caso si può porre il problema che la concentrazione necessaria per indurre l'anestesia chirurgica non si possa ottenere se non in condizioni iperbariche, dovendo garantire la contemporanea somministrazione di ossigeno con sufficiente pressione parziale (114 mmHg). L'impiego di anestetici in alta concentrazione può anche generare anossia diffusionale quando si interrompa l'anestesia: la diffusione dal plasma manterrà infatti il gas anestetico in alta concentrazione a livello alveolare, e l'aria inspirata, se non è arricchita di ossigeno, non potrà far pervenire agli alveoli il 15% di ossigeno necessario.

Finora abbiamo considerato solo la distribuzione del gas anestetico nell'acqua corporea, ma molti anestetici sono altamente liposolubili e si distribuiscono ampiamente anche nei compartimenti lipidici dell'organismo. È utile introdurre come parametro la solubilità del gas nei lipidi, intesa come coefficiente di ripartizione lipidi/sangue per il composto in esame. La presenza di lipidi nell'organismo comporta un aumento del volume di distribuzione apparente, pari al prodotto [volume dei compartimenti lipidici] \times [solubilità nei lipidi]. Va osservato che i compartimenti lipidici dell'organismo, e in special modo i depositi adiposi, sono molto poco perfusi e si equilibrano con estrema lentezza; pertanto, essi influenzano poco, in termini cinetici, l'andamento delle concentrazioni plasmatiche del gas anestetico sia durante l'induzione dell'anestesia che durante il recupero. È comunque opportuno tenere presente che, una volta raggiunto l'equilibrio, i depositi adiposi possono contenere (e quindi rilasciare molto lentamente dopo il recupero dall'anestesia) quantità rilevanti di anestetico. Ad esempio, per un anestetico come l'enflurano con coefficiente di solubilità nei lipidi uguale a 81, 10 l di depositi adiposi corrispondono a 810 l di sangue; pertanto, rispetto a un soggetto magro di 70 kg (50 l di acqua corporea), in un soggetto di 80 kg (di cui 10 di grasso), a parità di concentrazione ematica avremo all'equilibrio una quantità di enflurano $860/50 = 17,2$ volte superiore, e di questa $810/860$, ovvero il 94%, è contenuto nei depositi adiposi.

Si noti infine che l'osservazione appena svolta sulla scarsa rilevanza dell'equilibrio dei depositi adiposi rispetto alla cinetica di induzione e recupero dall'anestesia, vale in certa misura anche per l'equilibrio dell'acqua corporea: come più volte ricordato, la velocità con cui un compartimento si equilibra dipende dal rapporto tra flusso e volume. L'encefalo ha una perfusione specifica dell'ordine di 350 ml/kg per min contro un valor medio per il resto del corpo di 100 ml/kg per min; di conseguenza, in presenza di una concentrazione arteriosa stabile di anestetico, questo si equilibra a livello cerebrale in un tempo 3-4 volte più rapido dell'acqua corporea, cosicché i tempi di induzione e recupero possono essere 3-4 volte più rapidi (nell'ordine di 7 min per un anestetico poco solubile) di quanto stimato sopra considerando la cinetica di equilibrio all'acqua corporea totale.

Correzioni del regime terapeutico

Gli strumenti per la definizione di un protocollo terapeutico sono ben riassunti nel box 2 e nel **CD**: Approfondimento 53.1. *Monitoraggio terapeutico del farmaco*.

Nella frase "normale regime terapeutico per un individuo adulto" il termine "adulto" indica l'età media della popolazione utente di quel dato farmaco e il termine "normale" definisce il regime terapeutico che, impostato nella popolazione utente di quel farmaco, produce, in media, l'effetto desiderato. È però chiaro che il termine "normale" può variare in funzione dell'età media di insorgenza della malattia (ad esempio: antibiotici somministrati a tutte le età, farmaci inotropo-positivi somministrati per lo più negli anziani); l'uso di un farmaco normalmente prescritto nell'anziano, in cui la clearance renale è normalmente ridotta, a un paziente di età "diversa" può risultare in un insuccesso terapeutico se non si provvede a una correzione del dosaggio. Inoltre, fattori molteplici (in ordine di importanza: fattori genetici, malattie, età, peso, contemporanea assunzione di altri farmaci, fattori ambientali di vario genere) rendono eterogenea, dal punto di vista dell'efficacia terapeutica, una popolazione che è accomunata da una malattia. Questa eterogeneità può far sì che una dose, efficace nella maggioranza dei pazienti, risulti tossica per alcuni e inefficace per altri. Occorre quindi riconsiderare i singoli parametri farmacocinetici in modo tale che la loro introduzione nelle formule generali utilizzate per il calcolo della dose risultino, il più possibile, appropriate per ciascun individuo all'interno di una data popolazione. L'importanza dell'*ereditarietà genetica* è discussa in dettaglio nel Capitolo 54 e non verrà riesaminata in questo capitolo. Le conseguenze possono riflettersi non solo in variazioni delle proprietà farmacocinetiche di un farmaco (ad esempio: isoniazide e acetilatori lenti o veloci) ma anche in quelle farmacodinamiche (ad esempio: resistenza all'azione anticoagulante della warfarina).

L'età gioca un ruolo importante nella definizione dei diversi parametri farmacocinetici: basti pensare che la clearance renale è generalmente ridotta negli anziani. Purtroppo la maggior parte delle informazioni farmacocinetiche sui farmaci provengono da individui adulti, mentre l'età in cui più frequente e importante è la necessità di un intervento farmacologico sono quelle della prima infanzia e della vecchiaia. Le considerazioni che seguiranno si basano perciò su un numero limitato di osservazioni e possono quindi rappresentare solo un aspetto preliminare delle regole di comportamento che, certamente, verranno meglio definite in futuro.

I dati farmacocinetici comunemente forniti sono valori medi

Per definire un corretto regime terapeutico il medico dovrebbe conoscere la biodisponibilità del farmaco (frazione assorbita F), la clearance (Cl), il volume di distribuzione apparente (V_d) e poter stimare dagli ultimi due parametri il $t_{1/2}$. Questi valori sono forniti, per i farmaci più comunemente impiegati, nelle tavole di farmacocinetica di molti manuali di farmacoterapia e farmacologia clinica;

essi sono valori medi, che sono comunque soggetti a variabilità interindividuale (*SD*) dell'ordine del 20-50%. Benché ciò possa apparire a prima vista sufficiente per una adeguata impostazione del protocollo terapeutico, occorre sottolineare che impiegando i valori delle tabelle in modo meccanico l'unica garanzia è che nel 95% dei casi la concentrazione di equilibrio ottenuta sarà compresa tra il 35 e il 270% della concentrazione desiderata. Per farmaci a basso indice terapeutico tale approssimazione è assolutamente inaccettabile, e la posologia andrebbe definita sulla base di stime individuali di *Cl* e *V_d*. Anche per farmaci con buon indice terapeutico, alterazioni marcate di questi parametri possono comunque comportare la necessità di una revisione del regime posologico.

Variazioni del dosaggio in funzione del peso corporeo e costituzione fisica

I volumi idrici del corpo, la massa muscolare, il flusso ematico e la funzionalità di ciascun organo sono in stretta correlazione con il peso: di conseguenza il volume di distribuzione e la clearance variano parallelamente. Questi parametri vengono perciò comunemente espressi nelle relative unità di misura per chilo di peso corporeo. In pratica, si interviene con una correzione del dosaggio standard (che generalmente è riferito a individui adulti di 70 kg) quando il paziente differisce di più del 30% dalla media, in particolare nel caso di bambini.

Più importanti sono le considerazioni da fare quando varia la composizione del corpo: nel paziente obeso il volume di distribuzione di farmaci lipofili può variare anche più di quanto previsto dalla correzione per il semplice peso, mentre per farmaci polari sarà più utile considerare l'altezza e la struttura muscolare del paziente.

Variazioni del dosaggio in funzione dell'età

La figura 53.9 mostra le variazioni a cui va incontro la clearance della creatinina nel corso della vita. Ricordiamo che la creatinina si distribuisce in tutti i volumi idrici del corpo ed è quasi totalmente presente in forma libera sia nel sangue che nei tessuti; essa è eliminata dal rene e la sua clearance è pari alla velocità di filtrazione glomerulare. La clearance della creatinina (normalizzata per il peso corporeo) è bassa alla nascita, sale durante i primi mesi di vita per poi scendere con l'età ed essere di nuovo bassa nell'anziano.

La formula che mette in relazione la clearance della creatinina (*Cl_{cr}*) in un individuo sano di età superiore ai 20 anni con quella di un individuo "modello" (70 kg e 55 anni di età) è la seguente:

$$Cl \text{ (ml/min)} = [140 - \text{Età}] \cdot \frac{\text{Peso}}{70} \quad [15]$$

Da notare che anche altre funzioni importanti dal punto di vista farmacocinetico, come il flusso plasmatico renale totale, l'indice cardiaco e la capacità respiratoria massima, diminuiscono considerevolmente con il progredire dell'età. In pratica, l'anziano e il lattante sono da

considerarsi pazienti a clearance ridotta e quindi esposti a problemi di accumulo di farmaci. Come si vede chiaramente nella figura 53.9, l'opposto si ha per bambini a partire dal sesto mese di vita.

Gli aspetti più rilevanti della incompleta maturità fisiologica del lattante, per quanto riguarda la somministrazione di farmaci, sono legati alle ridotte capacità metaboliche ed emuntorie e alla diversa entità dei liquidi corporei. La tabella 53.1 riporta alcuni valori indicativi delle differenze nei parametri farmacocinetici del neonato rispetto all'adulto medio. Come illustrato dalla tabella, la clearance renale dei farmaci è notevolmente più bassa nel neonato, e dà luogo a emivite 3-4 volte più prolungate, anche a causa del volume d'acqua relativamente maggiore nel neonato rispetto al peso corporeo (si ricordi che l'emivita è proporzionale al rapporto tra *V_d* e *Cl*, rispettivamente maggiore e minore nel neonato se normalizzati al peso). Come si può intuire dal raffronto tra clearance di inulina e PAI, a una riduzione della filtrazione, dovuta a un minore flusso renale rispetto al volume d'acqua dell'organismo, si accompagna una ridotta capacità di secrezione attiva tubulare.

La capacità di secrezione tubulare cresce rapidamente nelle prime settimane di vita, e la maturazione sembra essere accelerata, soprattutto per il sistema di trasporto degli anioni organici, dalla presentazione dei substrati; in esperimenti su animali, è stato dimostrato che cuccioli di madri trattate con penicillina nelle ultime fasi della gravidanza mostravano già alla nascita uno sviluppo pressoché completo dei sistemi di secrezione tubulare degli acidi organici. Come già accennato discutendo la clearance epatica, anche la capacità di metabolizzazione ed escrezione epatica dei farmaci è ridotta nel neonato. La ridotta clearance può rappresentare un grave problema nel caso di somministrazione cronica di farmaci, specialmente se liposolubili, nel corso del puerperio. Nella vita uterina, il feto può essere considerato come un altro organo in equilibrio con il sangue materno e quindi con una capacità di clearance simile a quella della madre; dopo la nascita il farmaco, specialmente se è liposolubile, può ancora giungere nel neonato attraverso il latte e, date le ridotte capacità emuntorie e metabolizzanti, accumularsi fino a provocare effetti tossici.

Nei bambini la semplice riduzione del dosaggio in funzione del peso è spesso inaccurata. Questo è dovuto al fatto che gittata cardiaca, flussi renale ed epatico e velocità di filtrazione glomerulare sono più strettamente correlati alla superficie che al peso corporeo. Quindi il dosaggio nel corso di una terapia cronica va corretto servendosi del seguente rapporto:

$$\begin{aligned} \text{Dosaggio nel bambino} &= [16] \\ &= \left[\frac{\text{Superficie corporea in m}^2}{1,8 \text{ m}^2} \right] \cdot \text{Dosaggio nell'adulto} = \end{aligned}$$

dove 1,8 m² è il valore della superficie corporea di un adulto normale di 70 kg. La superficie corporea può essere stimata dal peso basandosi sull'osservazione che la prima è proporzionale al secondo elevato a 0,7. L'equazione [16] può essere riscritta perciò nel seguente modo:

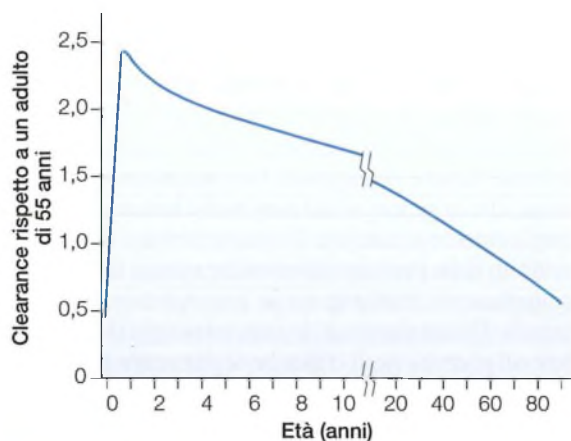


FIGURA 53.9 Variazioni della clearance/kg della creatinina nel corso della vita. I dati sono riportati assumendo come valore unitario la clearance media misurabile in soggetti sani, maschi, di 70 kg di peso e di 55 anni.

$$\text{Dosaggio nel bambino} = \left[\frac{\text{Peso del bambino in kg}}{70 \text{ kg}} \right]^{0.7} \cdot \text{Dosaggio nell'adulto} = \quad [17]$$

Per illustrare l'uso della formula espressa nell'equazione [17], consideriamo l'esempio del fenobarbital; il normale dosaggio per una terapia antiepilettica in un adulto è di 100 mg al giorno.

In un bambino del peso di 15 kg il dosaggio corretto è $(15/70)^{0.7} \cdot 100 \text{ mg/giorno} = 37 \text{ mg/giorno}$. Si noti come il dosaggio normalizzato per il peso corporeo è di 2,3 mg/kg nel bambino e 1,43 mg/kg nell'adulto: la ragione di questa discrepanza sta nel fatto che la clearance è proporzionale alla superficie corporea e che pertanto la clearance pro chilo aumenta con il diminuire del peso (esponente <1).

La correzione del dosaggio in funzione della superficie (o del peso) corporea non va eseguita in modo automatico per almeno due motivi fondamentali. In primo luogo, come appare chiaro dalla figura 53.9, la clearance pro chilo varia notevolmente nel corso della vita e soprattutto ai suoi estremi. In secondo luogo anche il V_d pro chilo è esposto a importanti variazioni per la diversa composizione dell'organismo (vedi nella tabella 53.1 come il valore percentuale di acqua corporea passi da 77 nel neonato a 60 nell'adulto).

L'aspetto cruciale è l'intento terapeutico! Nel caso di trattamento con somministrazione singola, la C_{eff} sarà determinata principalmente dal V_d (la dose pro chilo nel neonato e nel bambino dovrà essere più alta che nell'adulto). Qualora si operi attraverso somministrazioni ripetute, diventa cruciale l'emivita, ovvero il rapporto tra V_d e clearance (dosaggi pro chilo più bassi nel neonato e nell'anziano rispetto all'adulto e in genere dosaggi pro chilo più alti nel bambino). Si noti che la ridotta clearance del lattante non crea di per sé problemi nella somministrazione acuta di farmaci, poiché la conseguenza è solo un prolungamento della permanenza del farmaco in circolo, che potrebbe addirittura costituire un vantaggio. I problemi insorgono

con le somministrazioni ripetute, dove, come abbiamo visto, la concentrazione all'equilibrio cresce significativamente in presenza di prolungamenti rilevanti dell'emivita del farmaco. Va inoltre considerato il fatto che per tutta l'infanzia le capacità di metabolizzazione ed escrezione epatica sono notevolmente inferiori rispetto all'adulto.

Negli anziani, le capacità escretorie e metabolizzanti renali ed epatiche sono generalmente ridotte e vi può essere quindi il pericolo di accumulo nel corso di una terapia cronica. Non sono rari i casi di pazienti anziani che, sottoposti alla somministrazione cronica di farmaci a media emivita (è il caso, frequente, delle benzodiazepine impiegate come ipno-induttori) mostrano fenomeni di accumulo che danno luogo a effetti tossici o comunque alla persistenza continuativa degli effetti del farmaco (sedazione anche diurna, nel caso delle benzodiazepine, con talora segni di scarsa prontezza o addirittura di confusione mentale erroneamente attribuiti alla compromissione aterosclerotica del circolo cerebrale).

Per farmaci in cui i processi di eliminazione sono simili a quelli della creatinina, per determinare e personalizzare il dosaggio rispetto a quello standard possiamo fare uso della seguente formula che combina la [16] con la [17] e che è valida per qualunque soggetto di età superiore ai 20 anni e di qualunque peso:

$$\text{Dose} = \frac{[140 - \text{Età}] \cdot [\text{Peso (kg)}]^{0.7}}{1660} \cdot \text{Dose standard} \quad [18]$$

Il valore al denominatore è il prodotto tra il declino della clearance renale in un individuo di 55 anni $(140 - 55)$ e il peso di 70 kg elevato a 0,7.

Un ultimo aspetto da tenere in considerazione nell'anziano è costituito dalla possibile compromissione della efficienza della barriera ematoencefalica, a causa dell'insulto aterosclerotico. Farmaci idrosolubili che possono essere somministrati con tranquillità al paziente adulto medio, in quanto la loro penetrazione nel SNC è trascurabile, vanno somministrati con cautela in questi casi perché possono dare luogo a effetti centrali imprevisi.

Correzioni del dosaggio nel corso di patologie epatiche

Gravi alterazioni della biodisponibilità si hanno nel caso di shunt porta-cava per quei farmaci che normal-

TABELLA 53.1 Raffronto tra parametri farmacocinetici del neonato e dell'adulto

		Neonato medio	Adulto medio
Peso corporeo	(kg)	3,5	70
Acqua corporea	(%)	77	60
	(litri)	2,7	42
Clearance inulina (filtrazione glomerulare)	(ml/min)	3	130
	$t_{1/2}$ (min)	630	224
Clearance PAI (secrezione tubulare)	(ml/min)	12	650
	$t_{1/2}$ (min)	160	45

mente subiscono un forte effetto di primo passaggio. Nella maggioranza dei casi però, il problema maggiore che il medico incontra nel corso di patologie epatiche è riuscire a quantificare la variazione di clearance epatica (vedi Capitolo 51). Il secondo grosso problema è che il grado di compromissione delle caratteristiche farmacocinetiche può variare da farmaco a farmaco e, per uno stesso farmaco, a seconda del tipo di patologia in corso. Questa variabilità impedisce di stabilire delle regole generali utili per poter apportare modifiche ragionate dei regimi terapeutici e il medico dovrà rifarsi soprattutto ai dati empirici presenti in letteratura e all'attento controllo degli effetti che la terapia ha sul paziente.

Una conseguenza abbastanza comune delle patologie epatiche croniche è anche la riduzione della sintesi di proteine plasmatiche e la conseguente comparsa di ipoproteinemia. In questo caso la situazione è assai diversa rispetto a quanto già visto a proposito dello spiazzamento dal legame con le proteine plasmatiche da parte di un altro farmaco. In quel caso, il rapido rilascio dal deposito delle proteine plasmatiche provoca un aumento, in alcuni casi

anche molto rilevante, della quantità di farmaco libero presente nell'organismo e perciò anche della sua concentrazione sul sito d'azione (possibile insorgenza di effetti tossici). L'effetto è transitorio in quanto l'aumento della concentrazione libera comporta anche un pari aumento dell'eliminazione del farmaco. Nel caso di una ipoproteinemia, che in genere si instaura molto lentamente, viene semplicemente a mancare il compartimento di deposito costituito dalle proteine plasmatiche mentre tutti gli altri compartimenti mantengono le loro relazioni cinetiche normali. Di conseguenza, le concentrazioni del farmaco *libere* nel plasma e negli organi bersaglio saranno invariate. Intuitivamente: in condizioni di steady state, al corretto dosaggio corrisponde la concentrazione corretta di farmaco libero, e una velocità di eliminazione che compensa esattamente la somministrazione del farmaco; anche senza il serbatoio delle proteine plasmatiche, alla stessa concentrazione libera corrisponderà la stessa velocità di eliminazione e lo stesso regime di somministrazione.

A titolo di esempio, consideriamo un paziente in terapia con digitossina: al regime terapeutico di 100 mg/die, si

BOX 2 Impostazione del protocollo terapeutico

Le osservazioni e gli esempi presentati fin qui permettono di riassumere sinteticamente le relazioni importanti per la definizione di un protocollo terapeutico.

Si consideri di voler mantenere nel paziente una concentrazione efficace di un determinato farmaco. Prima di tutto consulteremo le tavole di farmacocinetica, che in genere ci forniranno i seguenti parametri:

- Biodisponibilità, B , di interesse per somministrazioni per os;
- Concentrazione efficace, C_{eff} ($\mu\text{g/ml}$ ovvero mg/litro);
- Clearance pro chilo, Cl_k (ml/min/kg);
- Volume di distribuzione apparente pro chilo, V_k (litri/kg).

Stabiliremo quindi il V_d del paziente (litri), dato dal prodotto $V_k \times [\text{peso del paziente}]$, e la clearance oraria del farmaco (litri/ora), $Cl = Cl_k \times 60 \times [\text{peso del paziente}] / 1000$.

Il primo problema è ora definire la dose giornaliera che andrà somministrata, D_{die} . Utilizzeremo quindi l'equazione [6], dando a T il valore di 24 (ore). Quindi:

$$\text{Dose giornaliera} = D_{die} = 24 \cdot \frac{C_{eff} \cdot Cl}{B}$$

espressa nella stessa unità di peso con cui è definita la concentrazione.

Definito l'intervallo tra le somministrazioni, T , in ore, la dose per ogni singola somministrazione sarà:

$$\text{Dose per ogni singola somministrazione} = D = \frac{D_{die} \cdot T}{24}$$

Spesso viene fornito da tavole di farmacocinetica il valore di $t_{1/2}$. In questo caso possiamo fare uso dell'equazione [7] per calcolare la concentrazione plasmatica media all'equilibrio di somministrazione (C_{eq}):

$$\text{Concentrazione plasmatica media all'equilibrio} = C_{eq} \text{ media} = 1,44 \frac{D \cdot B \cdot t_{1/2}}{T \cdot V_d}$$

avendo l'accortezza di esprimere T e $t_{1/2}$ nelle stesse unità di misura. Nel caso il valore di $t_{1/2}$ non fosse fornito, possiamo stimarlo ricordando che:

$$t_{1/2} = 0,693 \frac{V_d}{Cl} \text{ ore}$$

Per stabilire l'intervallo più opportuno tra le somministrazioni, dobbiamo fare riferimento al valore dell'emivita. Se accettiamo che all'equilibrio le fluttuazioni della concentrazione plasmatica siano del 50% del picco massimo, sceglieremo un intervallo tra le somministrazioni $T = t_{1/2}$. Se vogliamo che le fluttuazioni siano limitate al 20%, sceglieremo un intervallo attorno a $T = 1/3$ di $t_{1/2}$. Se le fluttuazioni non devono superare il 10% dovremo ridurre T a circa $1/7$ di $t_{1/2}$ e così via.

Il tempo necessario a raggiungere una concentrazione media C_{eff} sarà di 4-5 emivite, ovvero tempo di accumulo $\approx 3 \cdot V_d / Cl$ (ore).

TABELLA 53.2 Esempio di variazioni dei parametri farmacocinetici della digitossina nel corso di ipoproteinemia

Dose/die mg	$t_{1/2}$ giorni	Dose $t_{1/2}$ mg	Legame %	V_d litri	Cl l/h	C_{plasm} ng/ml	C_{libera} ng/ml
0,1	7	0,7	97	35	3,5	20	0,6
0,1	7	0,7	90	117	11,5	6	0,6

V_d e Cl rappresentano litri di plasma e litri di plasma/ore e perciò i loro valori cambiano insieme a quelli della concentrazione plasmatica a parità di concentrazione nei tessuti

ottiene una concentrazione plasmatica totale di 20 ng/ml. Essendo il farmaco legato al 97% alle proteine plasmatiche, la concentrazione della quota libera (in equilibrio con il resto del corpo) è di 0,6 ng/ml (Tabella 53.2). Quando nello stesso paziente si instaura una ipoproteinemia che riduce la quota legata al 90%, la stessa dose è in grado di produrre la stessa concentrazione libera in quanto V_d e Cl mutano di pari passo. Si noti come la concentrazione plasmatica totale sia invece sostanzialmente ridotta. In pratica in questi casi è buona norma cercare di ottenere dal laboratorio di analisi chimico-cliniche informazioni relative alla concentrazione plasmatica libera piuttosto che quella totale.

Correzioni del dosaggio in corso di patologie renali

La clearance renale dei farmaci può mostrare variabilità notevole nell'ambito della popolazione normale (deviazione standard fino al 50%). Spesso nelle tavole di farmacocinetica, per i farmaci a clearance renale più variabile è riportata una relazione che permette di ottenere una stima approssimata della clearance del farmaco sulla base della clearance della creatinina, Cl_{Cr} . Quest'ultima, a sua volta, viene comunemente stimata in base alla concentrazione plasmatica della creatinina impiegando la relazione:

Qualora si voglia accelerare la fase di accumulo, si può impiegare una dose di accumulo, singola o frazionata, calcolabile in base alla concentrazione efficace e al volume di distribuzione del farmaco:

$$\text{Dose di accumulo } (D_{acc}) = C_{eff} \cdot V_d$$

ovvero,

$$\text{in funzione della dose di mantenimento } D_{acc} = \frac{D \cdot V_d}{Cl \cdot T} = 1,44 \frac{D \cdot t_{1/2}}{T}$$

Si tenga presente che a seguito della somministrazione il farmaco potrebbe impiegare un tempo significativo a distribuirsi in tutto il suo volume apparente di distribuzione, per cui le dosi di accumulo possono determinare concentrazioni plasmatiche molto più elevate di quanto previsto dalle relazioni sopra esposte, e capaci di produrre effetti tossici.

Per farmaci eliminati in grossa misura per via renale e aventi finestra terapeutica ristretta, il dosaggio va modificato in caso di ridotta funzionalità renale; si può fare riferimento alla riduzione della Cl della creatinina (Cl_{Cr}) nel paziente per ridurre proporzionalmente il dosaggio. Per farmaci eliminati sia per via renale (Cl_R) che extrarenale (Cl_{NR}), la riduzione deve tenere conto che la Cl non renale non è modificata. Si può applicare la seguente formula per calcolare il grado di riduzione della Cl totale (Cl_T) e quindi della dose da somministrare: Riduzione dose =

$$\frac{[(Cl_{Cr} \text{ paz} / Cl_{Cr} \text{ norm}) \cdot (Cl_R \text{ farmaco}) + (Cl_{NR} \text{ farmaco})]}{Cl_T \text{ farmaco}}$$

Nel bambino la dose va ridotta rispetto all'adulto facendo riferimento alla superficie corporea o utilizzando la seguente formula:

$$\text{Dosaggio nel bambino} = \left[\frac{\text{Peso del bambino in kg}}{70 \text{ kg}} \right]^{0,7} = \text{dosaggio nell'adulto}$$

Quello che segue è un esempio di come le formule riportate in questo Box possano servire a impostare un protocollo terapeutico. Il farmaco da utilizzare in un paziente di 75 kg è l'atenololo.

$$\begin{array}{lll} B & 56 \pm 30\% & Cl_k & 2,4 \pm 0,2 \text{ ml/min/kg} & t_{1/2} & 6,1 \pm 2,0 \text{ ore} \\ C_{eff} & 0,5 - 1,0 \text{ mg/l} & V_k & 0,95 \pm 0,15 \text{ l/kg} & & \end{array}$$

Nel paziente in cura il V_d è $0,95 \times 75 = 71,25$ l. Il peso di una singola dose somministrata ogni 6 ore necessaria per ottenere una C_{eq} di 0,75 mg/l può essere ricavato dalla formula della concentrazione plasmatica media all'equilibrio:

$$D = C_{eq} \times T \times V_d \times 0,693 / B \times t_{1/2} = 0,75 \text{ mg/l} \times 6 \text{ ore} \times 71,25 \text{ l} \times 0,693 / 0,56 \times 6,1 \text{ ore} = 65 \text{ mg}$$

La differenza tra le concentrazioni minime e massime è stimabile dal rapporto $D / V_d = 65 \text{ mg} / 71,25 \text{ l} = 0,91 \text{ mg/l}$. Il farmaco è eliminato al 95% per escrezione renale: se insorge insufficienza renale con Cl_{Cr} ridotta a metà del valore normale, la dose di 65 mg dovrà essere somministrata ogni 12 ore. In alternativa si potrà somministrare metà della dose ogni 6 ore; in quest'ultimo caso l'entità delle fluttuazioni sarà ridotta.

$$Cl_{cr} = \frac{[140 - Et\grave{a}] \cdot [Peso (kg)]^{0,7}}{72 \cdot creatininemia (mg/100 ml)} \quad (ml/min) \quad [19]$$

Nella donna si sostituisce il valore 72 con 85.

La valutazione della clearance renale del farmaco è ovviamente di grande importanza per i farmaci escreti prevalentemente per questa via, nei soggetti che presentano patologie renali e in generale compromissione della funzione renale; le correzioni del dosaggio si renderanno necessarie in queste condizioni soprattutto se la finestra terapeutica del farmaco è ristretta. La riduzione dell'eliminazione comporta un aumento dell'emivita e quindi:

- un aumento del tempo necessario per il raggiungimento dell'equilibrio in corso di somministrazioni ripetute;
- una riduzione dell'entità delle fluttuazioni della concentrazione plasmatica durante l'intervallo tra le somministrazioni;
- un aumento della concentrazione plasmatica media a parità di dosaggio.

A quest'ultimo inconveniente si può rimediare modificando la dose somministrata nell'unità di tempo di un valore percentuale pari a quello di riduzione della clearance della creatinina. Per quei farmaci che oltre a essere eliminati per via renale sono eliminati per altre vie, la riduzione dovrà tenere conto dei rapporti numerici esistenti tra clearance renale e non renale. Ad esempio, per un farmaco la cui clearance renale (Cl_r) è di 100 ml/min e quella non renale (Cl_{nr}) è di 80 ml/min, la clearance totale è di $100 + 80 = 180$ ml/min. In un paziente con clearance della creatinina ridotta del 50%, la Cl_r scende a 50 ml/min mentre la Cl_{nr} rimane 80 ml/min e la Cl_t è $50 + 80 = 130$. La variazione

di Cl_t totale è quindi data dal rapporto Cl_t paziente / Cl_t normale; nel caso esemplificato tale valore è $130 / 180 = 0,72$. Poiché la dose necessaria per mantenere una data concentrazione plasmatica del farmaco è direttamente proporzionale al valore di Cl_t , la dose dovrà essere ridotta di un pari valore. Per scopi pratici potrà essere utile servirsi delle seguenti formule in cui i termini norm e paz stanno per "normale" e "paziente" rispettivamente:

$$Dose\ paz = dose\ standard \cdot (Cl_t\ paz / Cl_t\ norm) \quad [20]$$

in cui il rapporto tra le Cl totali del paziente e dell'individuo normale è ricavabile dalle relative Cl della creatinina secondo la seguente equazione:

$$\begin{aligned} Cl_t\ paz / Cl_t\ norm &= & [21] \\ &= \frac{(Cl_{cr}\ paz / Cl_{cr}\ norm) \cdot (Cl_{R\ farmaco}) + (Cl_{NR\ farmaco})}{Cl_{T\ farmaco}} \end{aligned}$$

Ad esempio, si vuole mantenere la concentrazione plasmatica della diisopiramide (un antiaritmico) al valore di 3 mg/litro. I dati farmacocinetici sono i seguenti: $T_{1/2} = 6h$; $V_d = 0,6$ litri/kg. In un soggetto di 70 kg, 40 anni e creatininemia normale di 1 mg/100 ml, otteniamo dalla formula [8] che il dosaggio corretto è 0,5 g/die. Il farmaco è eliminato al 55% attraverso il rene. Nel paziente insorge insufficienza renale con creatininemia aumentata a 2 mg/100 ml. Dalla [19] si stima che la funzionalità renale è ridotta circa del 50%. Di conseguenza, per mantenere inalterata la concentrazione plasmatica della diisopiramide occorrerà cambiare il dosaggio che, servendosi delle [20] e [21] diventa: $(0,5\ g/die) \cdot (55/2+45) / 100 = 0,36\ g/die$.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Il protocollo terapeutico mira a raggiungere la concentrazione efficace del farmaco nel plasma.
- ▶ In acuto, la dose si determina in base al prodotto concentrazione efficace \times volume di distribuzione. Diverse velocità di assorbimento e eliminazione possono però modificare l'altezza e il tempo del picco di concentrazione plasmatica.
- ▶ Il farmaco si distribuisce nei vari compartimenti con velocità proporzionale al flusso ematico specifico. Il farmaco può pertanto avere una azione breve su organi molto perfusi (ad esempio cervello), che si esaurisce per redistribuzione e non per eliminazione.
- ▶ Una concentrazione plasmatica stabile si può ottenere attraverso somministrazioni ripetute: per raggiungere lo stato stazionario occorrono 4-5 emivite.
- ▶ Il dosaggio si calcola sulla base della clearance del farmaco (dosaggio = quantità eliminata nell'unità di tempo = concentrazione efficace \times clearance), e andrà pertanto modificato in condizioni di alterata clearance.

Bibliografia essenziale

- ▶ Alcorn J, Mcnamara PJ. Pharmacokinetics in the newborn. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:667-86.
- ▶ Gandhi M, Aweeka F, Greenblatt RM, Blaschke TF. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:499-523.
- ▶ Leahy DE. Progress in simulation modelling for pharmacokinetics. *Curr Top Med Chem.* 2003;3:1257-68.
- ▶ Mangoni AA, Jackson SM. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol* 2004;57:6-14.
- ▶ Pichette V, Leblond FA. Drug metabolism in chronic renal failure. *Curr Drug Metab* 2003;4:91-103.

Farmacogenetica e personalizzazione della terapia

CAPITOLO

54

Diego Fornasari

Obiettivi formativi

- Comprendere le conseguenze molecolari dei polimorfismi sui geni codificanti per le proteine coinvolte nella risposta ai farmaci
- Comprendere le conseguenze farmacologiche e cliniche dei polimorfismi
- Comprendere il ruolo della farmacogenetica nei processi di personalizzazione della terapia

È ben noto che pazienti diversi possano rispondere in maniera diversa a un medesimo farmaco, generando uno spettro continuo di risposte cliniche in cui gli effetti terapeutici e le reazioni avverse sono diversi e variamente combinati nei diversi individui. In passato questa variabilità inter-individuale veniva principalmente spiegata alla luce di fattori non genetici quali l'età, lo stato della funzionalità renale ed epatica, lo stile di vita, con particolare riferimento alla dieta e all'abuso di alcol e fumo, o la concomitante assunzione di altri farmaci. Sebbene tutti questi fattori possano certamente essere coinvolti e in specifiche circostanze giustificare da soli la diversa risposta clinica al medesimo trattamento farmacologico, attualmente si ritiene che la risposta individuale ai farmaci abbia sempre una componente genetica, la quale rende conto, in alcune circostanze, fino al 95% della variabilità nelle risposte cliniche a un determinato farmaco.

La variabilità individuale nella risposta al trattamento farmacologico costituisce uno dei problemi più rilevanti nella pratica clinica, essendo responsabile di fallimenti terapeutici e di reazioni avverse che a loro volta, oltre a danneggiare gravemente il paziente, causano prolungati ricoveri e aumentati costi sanitari. Si è stimato che negli Stati Uniti gravi reazioni avverse ai farmaci (ADR) si verificano nel 6,7% della popolazione ospedalizzata e nello 0,32% abbiano esiti fatali, costituendo la quarta causa di morte, con costi che sfiorano i 100 miliardi di dollari all'anno.

Tra il 1998 e il 2005 le segnalazioni di ADR gravi raccolte dalla FDA sono aumentate di 2,6 volte e il loro incremento è stato 4 volte più rapido di quello del numero totale di prescrizioni.

Questi dati indicano in maniera inequivocabile l'importanza di prevedere e di prevenire l'insorgenza di ADR.

La farmacogenetica è la disciplina che studia le basi genetiche della variabilità inter-individuale nella risposta ai farmaci

La farmacogenetica, termine coniato da Vogel nel 1959, è la disciplina che studia come l'assetto genetico degli individui influenzi l'azione dei farmaci a essi somministrati, con l'obiettivo ultimo di predire e quindi prevenire reazioni avverse e fallimenti terapeutici, ma anche di favorire l'identificazione del farmaco giusto e del suo corretto dosaggio per ogni singolo paziente. Spesso i termini "farmacogenetica" e "farmacogenomica" vengono utilizzati in maniera intercambiabile, con l'idea che la farmacogenomica rappresenti l'evoluzione su scala genomica della farmacogenetica.

In questo capitolo si preferisce definire lo studio delle variazioni interindividuali nella sequenza del DNA in relazione alla risposta ai farmaci esclusivamente con il termine farmacogenetica.

Le basi genetiche della risposta individuale ai farmaci

Il genoma umano contiene variazioni nella sequenza e nella struttura del DNA

La presenza di numerose variazioni nella sequenza del DNA tra individui diversi era un fenomeno già largamente apprezzato al completamento del sequenziamento del genoma umano, quando, in un articolo di accompagnamento, si confermò l'esistenza di almeno 1,42 milioni di polimorfismi a singolo nucleotide. Successivi progetti ad hoc, come "HapMap" e l'ancora in corso "1000 genomes" hanno esteso le dimensioni di questa

provvisoria valutazione a svariati milioni, permettendo l'identificazione di tutti i polimorfismi con una frequenza superiore al 5%. In generale, si ritiene che la gran parte dei geni nell'uomo contenga variazioni di sequenza tra individui, cioè che i geni siano presenti sotto forma di varianti alleliche diverse. Ovviamente, anche lo stesso individuo può possedere un determinato gene in due varianti alleliche diverse (eterozigote). I polimorfismi possono essere di diverso tipo, ma i più numerosi sono i polimorfismi a singolo nucleotide, che nella letteratura scientifica internazionale vengono identificati con la sigla SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). Come detto, si tratta appunto di variazioni nella sequenza del DNA a causa delle quali due individui possono presentare in una identica posizione dei rispettivi genomi due diversi nucleotidi (Figura 54.1).

I cSNPs e i pSNPs determinano l'esistenza di varianti alleliche dei geni responsabili della risposta ai farmaci

Gli SNPs vengono classificati in base alla posizione che essi hanno nel contesto dei geni.

- Gli SNP delle regioni codificanti (cSNP) sono localizzati negli esoni e la loro presenza può modificare la sequenza amminoacidica di una proteina (vedi CD: Approfondimento 54.1. *Polimorfismi genetici*).
- Gli SNP perigenici (pSNP) interessano le regioni regolatorie (promotori, enhancer), le regioni specificanti le porzioni a monte e valle dell'mRNA, gli introni, con particolare riferimento alle giunzioni di splicing; la presenza di questi SNP può interferire con i livelli di espressione di una proteina (trascrizione, stabilità e traducibilità del messaggero), ma anche con la sua struttura nel caso in cui essi interferiscano con lo splicing; particolare interesse ha destato negli ultimi anni la presenza di polimorfismi nelle regioni specificanti i 3' UTR degli mRNA. Queste regioni dell'mRNA sono infatti il bersaglio dell'azione dei miRNA (vedi Capitolo 21) che potrebbero regolarne la traducibilità o la stabilità. Esistono già numerosi esempi di polimorfismi in queste regioni che disturbano l'appaiamento tra miRNA e RNA con conseguenti alterazioni nell'espressione

dello specifico gene. Ad esempio, è stato dimostrato che un polimorfismo nel sito di legame di un miRNA nel 3' UTR dell'mRNA della diidrotolato reduttasi (DHFR) causa il mancato appaiamento del miRNA stesso, eccessiva espressione della DHFR e quindi resistenza al metotrexate, un farmaco inibitore reversibile dell'enzima impiegato nel trattamento di diversi tumori e come immunosoppressore.

- Gli SNP random (rSNP) si trovano nelle regioni intergeniche, cioè in quelle regioni che non contengono geni, ma che costituiscono il 98,5% del genoma umano. Gli rSNPs non hanno un effetto diretto sull'espressione dei geni, ma rivestono un ruolo "diagnostico" molto rilevante poiché, sfruttando un fenomeno noto come *linkage disequilibrium*, possono essere impiegati per l'identificazione di nuovi geni coinvolti in patologie o in determinati fenotipi farmacogenetici.

Copy Number Variation:

un nuovo fattore di eterogeneità genetica

Un altro tipo di polimorfismo che ha grande rilevanza in farmacogenetica prende il nome di *Copy Number Variation* (CNV). Si tratta di variazioni strutturali del DNA caratterizzate dalla presenza di meno o più di due copie (ad esempio 1 copia o 3 copie) di regioni genetiche della lunghezza compresa tra 1 kilobase fino a numerose megabasi. Se queste regioni contengono geni, ecco che un individuo portatore di CNV potrebbe possedere nel suo genoma, invece che le attese due copie, 0, 1 o più di due copie del gene contenuto nella regione di variazione strutturale. Se il prodotto genico è coinvolto nella risposta al trattamento farmacologico, la CNV diventa una fonte importantissima di variabilità individuale al farmaco. Si vedrà in seguito che questo è il caso del CYP2D6 il cui gene può essere presente fino a 13 copie perfettamente funzionanti.

Geni e farmacogenetica

I geni che determinano la risposta ai farmaci possono essere distinti in due grandi classi: i geni codificanti per il bersaglio terapeutico primario, come ad esempio recettori, canali ionici o enzimi, e i geni codificanti per proteine coinvolte nell'assorbimento, nella distribuzione, nel metabolismo e nell'escrezione del farmaco. Polimorfismi a carico di geni appartenenti a queste due classi possono pertanto determinare modificazioni nell'azione di un farmaco di natura sia farmacocinetica che farmacodinamica, provocando la comparsa di effetti avversi o l'assenza di risposta clinica a un determinato trattamento.

Polimorfismi genetici e metabolismo dei farmaci

Il metabolismo dei farmaci, e più in generale degli xenobiotici, è un processo che avviene prevalentemente, ma non esclusivamente, a livello epatico con lo scopo ultimo di rendere più idrosolubili le sostanze introdotte nell'organismo favorendone la eliminazione con la bile



FIGURA 54.1 Differenze genetiche nella popolazione. In una medesima posizione nel genoma, due individui presentano variazioni di sequenza a livello di un singolo nucleotide.

e con le urine. Come più dettagliatamente descritto nel capitolo 52, il metabolismo dei farmaci è un processo a più fasi: le reazioni di fase I sono essenzialmente reazioni di funzionalizzazione che rendono i substrati maggiormente reattivi per favorire le successive reazioni di fase II, le quali sono reazioni di coniugazione che rendono, come detto, i substrati più idrosolubili. Anche dopo queste modificazioni chimiche, spesso l'eliminazione di molti xenobiotici non è meramente un processo passivo, ma richiede la presenza di meccanismi di eliminazione che vanno nel loro complesso a costituire la cosiddetta fase III.

Polimorfismi genetici a singolo nucleotide sono stati dimostrati in numerosi geni codificanti per enzimi operanti in ciascuna delle fasi di metabolizzazione dei farmaci con conseguenze funzionali diverse a carico del prodotto genico. In particolare, si è potuto ad esempio dimostrare l'esistenza di varianti alleliche completamente inattive di membri della superfamiglia del citocromo P450, quali *CYP2D6*, *CYP2C19* o *CYP2A6*, in cui i polimorfismi a singolo nucleotide causano l'introduzione di codoni di stop, con la conseguente produzione di proteine troncate, o determinano sostituzioni amminoacidiche, con la conseguente produzione di proteine enzimaticamente inattive. In altri casi, come per gli enzimi di fase II N-acetyltransferasi di tipo 1 e 2 (*NAT1* e *NAT2*), si sono identificate varianti alleliche con ridotta attività enzimatica o con ridotta emivita proteica: in entrambi i casi il fenotipo consisteva in un ridotto metabolismo di alcuni farmaci. È opportuno qui ricordare che per un dato *locus* genico autosomico, essendo il corredo cromosomico diploide, esistono sempre due alleli ereditati rispettivamente dal padre e dalla madre: se i due alleli sono identici si parla di omozigosi, mentre se sono diversi, a causa della presenza di varianti come nel caso degli enzimi di fase I e II, si parla di eterozigosi. Poiché nel caso degli enzimi preposti al metabolismo degli xenobiotici entrambi gli alleli contribuiscono alla produzione del prodotto proteico (non vi è cioè silenziamento funzionale di uno dei due alleli, come accade in un clone di plasmacellule attraverso il fenomeno di esclusione allelica), la presenza di una variante allelica completamente inattiva in eterozigosi determinerà, in linea di principio, la produzione del 50% di enzima rispetto a un soggetto con due alleli perfettamente attivi, mentre la presenza di una variante allelica completamente inattiva in omozigosi causerà l'assenza totale dell'enzima stesso. È evidente quindi che i quadri clinici derivanti dalla somministrazione di un determinato farmaco dipenderanno per gravità o più semplicemente per intensità dall'assetto genotipico dell'individuo, relativamente agli alleli codificanti per lo specifico enzima coinvolto. È opportuno comunque sottolineare che alcuni farmaci possono essere metabolizzati da più di un enzima di fase I o di fase II, sebbene spesso con differente efficienza, e che pertanto è la combinazione delle varianti alleliche presenti nei due o più *loci* coinvolti a determinare il profilo farmacogenetico di quell'individuo in risposta a quel determinato farmaco. L'idea che i profili farmacogenetici siano più frequentemente determinati dalla concomitante azione di più geni verrà ulteriormente discussa in seguito.

Polimorfismi genetici nei geni codificanti per gli enzimi di fase I

I polimorfismi del *CYP2D6* costituiscono un esempio paradigmatico in farmacogenetica

I membri della famiglia del citocromo P450 sono gli enzimi maggiormente coinvolti nelle reazioni di fase I. A tutt'oggi sono state identificate circa 60 diverse isoforme di *CYP450*, attualmente classificate in almeno 17 famiglie e relative sottofamiglie, ma il 72% dei citocromi espressi a livello epatico è costituito da una decina di membri appartenenti a sette sottofamiglie, come indicato nella tabella 54.1. Per tutti questi citocromi sono state identificate numerose varianti alleliche e per molte di esse esistono precise correlazioni con la risposta individuale a determinati farmaci.

Sebbene il *CYP2D6* rappresenti solamente l'1,5% del contenuto in citocromi del fegato, lo studio dei suoi polimorfismi in relazione alla risposta individuale ad alcune classi di farmaci costituisce ancora oggi uno degli esempi più chiari delle enormi implicazioni cliniche della farmacogenetica, avendo fornito informazioni, approcci metodologici e concetti che sarebbero stati impiegati successivamente per lo studio delle varianti alleliche di altri membri della superfamiglia del citocromo P450. Il primo polimorfismo del *CYP2D6* venne scoperto verso la fine degli anni 70 in relazione ad abnormi risposte pressorie osservate in alcuni pazienti trattati con un farmaco antipertensivo, la debrisoquina. Da quei primi studi, le varianti alleliche conosciute del *CYP2D6* sono diventate più di 50, con polimorfismi a singolo nucleotide che possono determinare una completa inattivazione allelica con conseguente assenza dell'enzima, la produzione di un enzima inattivo o ad attività limitata o con una modificata specificità di substrato o persino con un'aumentata attività catalitica (Tabella 54.2). A tutto ciò si deve aggiungere il fatto che, come già accennato, il *CYP2D6* è soggetto a CNV, con individui che possono possedere da 0 fino a 13 copie perfettamente funzionali dell'enzima. CNV del *CYP2D6* sono particolarmente frequenti in Etiopia e in Arabia Saudita (con una prevalenza che in alcune aree raggiunge circa il 29%, Tabella 54.3), ma sono anche presenti nei Paesi che si affacciano sul bacino del

TABELLA 54.1 Contenuto epatico di citocromi P450

Isoforma di CYP	% totale*
CYP1A2	12,7
CYP2A6	4,0
CYP2B6	0,2
CYP2C	18,2
CYP2D6	1,5
CYP2E1	6,6
CYP3A	28,8

* Media della percentuale del contenuto epatico totale di citocromi P450, misurato in microsomi epatici di 60 individui (30 caucasici, 30 giapponesi).

TABELLA 54.2 Polimorfismi nei geni codificanti alcuni membri della superfamiglia del citocromo P450 e loro effetti molecolari e clinici

Enzima	Principali varianti alleliche	Conseguenze molecolari del SNP	Conseguenze funzionali del SNP	Principali farmaci metabolizzati	Quadri clinici
CYP2C9	CYP2C9*2	Arg144Cys	Ridotta attività	Warfarin Fenitoina Tolbutamide FANS	Sanguinamento Ipoglicemia
	CYP2C9*3	Ile359Leu	Alterata specificità di substrato		
CYP2C19	CYP2C19*2	Splicing aberrante	Enzima inattivo	Omeprazolo	Migliore risposta clinica e più efficace eradicazione di <i>Helicobacter pylori</i>
	CYP2C19*3	Inserzione codone di stop	Enzima inattivo		
CYP2D6	CYP2D6*4	Splicing aberrante	Enzima inattivo	Antidepressivi Antipsicotici β-bloccanti	Discinesia tardiva da antipsicotici, cardiotoxicità da antidepressivi triciclici
	CYP2D6*10	Pro34Ser, Ser486Thr	Enzima instabile		
	CYP2D6*17	Thr107Ile, Arg2965Cys, Ser486Thr	Ridotta affinità per i substrati		
	CYP2D6*2xN	Copy Number Variations	Aumentata attività enzimatica		

Mediterraneo, inclusa l'Italia, con frequenze oscillanti tra il 5 e il 10%. La conseguenza di questo enorme numero di varianti alleliche del CYP2D6, codificanti per enzimi che possono differire da individuo a individuo per quantità e funzionalità, è l'enorme variabilità di attività enzimatica del CYP2D6 in vivo, con differenze nella popolazione, relativamente al metabolismo di alcuni farmaci substrato di questo citocromo, che raggiungono le 1000 volte. Questo concetto è meglio esemplificato nella figura 54.2A che illustra uno studio farmacocinetico in volontari sani "stratificati per genotipo", cioè divisi in base al numero di copie funzionali di CYP2D6. A tutti i soggetti veniva somministrata per via orale un'unica e identica dose di nortriptilina e la concentrazione plasmatica del farmaco veniva misurata nelle successive 72 ore. La nortriptilina è un antidepressivo triciclico che può causare quale evento avverso cardiotoxicità, in virtù del suo stesso meccanismo d'azione di inibizione del "reuptake" delle catecolamine e dell'azione antagonista sui recettori muscarinici e α₁-adrenergici. Questo evento avverso è largamente dipendente dalla concentrazione plasmatica del farmaco che, come mostrato nella figura 54.2A, varia in relazione all'assetto genotipico degli individui per quanto concerne il CYP2D6: a parità di dosaggio, gli individui che non possiedono neanche una copia funzionante di CYP2D6

raggiungono, in seguito a un'unica somministrazione orale, concentrazioni plasmatiche di nortriptilina al picco più alte e conservano concentrazioni elevate del farmaco per tempi prolungati, come conseguenza della ridotta eliminazione e quindi dell'aumentata emivita del farmaco stesso. In altri termini i non-metabolizzatori presentano un'area sotto la curva (AUC) più estesa rispetto ai soggetti dotati di 2 copie funzionanti di citocromo. Come regola generale, i non-metabolizzatori svilupperanno più frequentemente reazioni avverse con tutti quei farmaci inattivati dal CYP2D6; viceversa gli individui portatori di 13 copie funzionali di CYP2D6 andranno incontro, con i medesimi farmaci, a fallimenti terapeutici, poiché la loro rapidissima metabolizzazione non consentirà il raggiungimento di dosi efficaci al sito d'azione.

Le varianti alleliche dei membri della sottofamiglia CYP2C: i casi opposti del CYP2C9 e CYP2C19

Come detto precedentemente, gli studi sul CYP2D6 sono stati rapidamente seguiti da altrettanti studi indirizzati a identificare varianti alleliche negli altri membri della superfamiglia del citocromo P450, con particolare riferimento alla sottofamiglia del CYP2C, che è la seconda maggiormente espressa a livello epatico, dopo quella del CYP3A (Tabella 54.1).

Come riassunto nella tabella 54.2, è stata dimostrata l'esistenza di varianti alleliche del CYP2C9 (CYP2C9*2 e CYP2C9*3) codificanti per enzimi con ridotta funzionalità. In individui portatori di questi varianti, e in particolare modo negli omozigoti, la somministrazione di dosi "standard" di warfarin è più frequentemente accompagnata da emorragie. Poiché la frequenza degli alleli CYP2C9*2 e CYP2C9*3 è rispettivamente dell'8-13% e 6-9% nei Caucasici (Tabella 54.3), questo profilo farmacogenetico deve considerarsi relativamente comune nel nostro Paese.

I polimorfismi nei geni codificanti per gli enzimi di fase I non sempre causano la comparsa di effetti avversi: talvolta favoriscono invece una migliore risposta al trattamento farmacologico. È questo il caso dei polimorfismi che interessano il CYP2C19. Come indicato nella tabella 54.2, esistono due varianti alleliche inattive di questo

TABELLA 54.3 Frequenza di alcuni varianti alleliche di membri della superfamiglia del citocromo P450 in diverse popolazioni

Varianti	Caucasici	Asiatici	Neri africani	Etiopi e Arabi sauditi
CYP2C9*2	8-13	0	ND	ND
CYP2C9*3	6-9	2-3	ND	ND
CYP2C19*2	13	23-32	13	14-15
CYP2C19*3	0	6-10	ND	0-2
CYP2D6*4	12-21	1	2	1-4
CYP2D6*10	1-2	51	6	3-9
CYP2D6*17	0	ND	34	3-9
CYP2D6*2xN	1-5	0-2	2	10-16

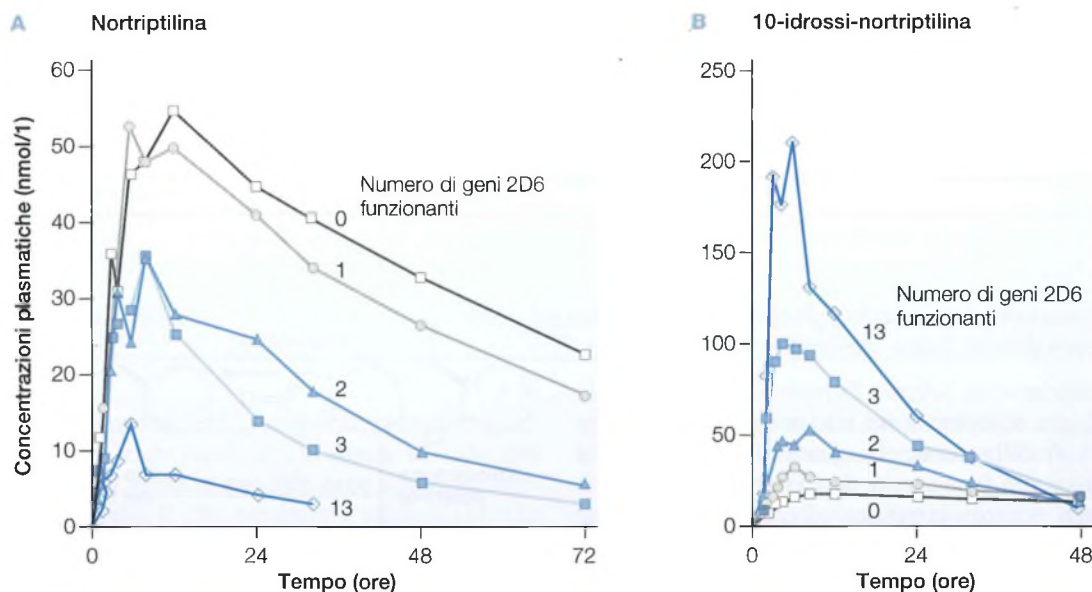


FIGURA 54.2 Effetti farmacocinetici dei polimorfismi del CYP2D6. **A.** Diversi soggetti stratificati sulla base del genotipo del CYP2D6 sono stati trattati con un'unica dose orale di nortriptilina e la concentrazione plasmatica del farmaco è stata misurata a tempi diversi. **B.** Negli stessi soggetti stratificati sulla base del genotipo del CYP2D6 sono stati misurati i livelli plasmatici del metabolita della nortriptilina a tempi diversi.

citocromo, denominate CYP2C19*2 e CYP2C19*3, la cui prevalenza è molto oscillante nelle diverse popolazioni caucasiche studiate, ma è molto più elevata negli Asiatici, con punte del 70% in un'isola della Melanesia (Tabella 54.3). Indipendentemente dalla frequenza e dal diverso background genetico, l'effetto clinico di queste varianti alleliche è identico in Asiatici e Caucasici come recentemente dimostrato da uno studio italiano: gli individui omozigoti per la variante allelica normale CYP2C19*1 trattati con inibitori della pompa gastrica guariscono meno frequentemente dall'*Helicobacter pylori* rispetto agli eterozigoti portatori di un allele inattivo o agli omozigoti con entrambi gli alleli inattivi. La spiegazione di queste diverse risposte cliniche ha ancora una volta basi farmacocinetiche: i portatori di alleli CYP2C19*2 e CYP2C19*3 hanno una maggiore area sotto la curva rispetto ai pazienti omozigoti per l'allele "normale" CYP2C19*1 e pertanto un aumentato effetto inibitorio sulla secrezione gastrica.

Gli enzimi di fase I nell'attivazione di profarmaci: farmacogenetica e fallimenti terapeutici

I farmaci non sempre vengono assunti come tali, cioè come molecole già attive in grado di interagire con il proprio bersaglio molecolare. In alcuni casi i farmaci vengono introdotti nell'organismo come pro-farmaci, cioè come molecole inattive che necessitano di essere metabolizzate in forma attiva proprio da alcuni degli enzimi di fase I descritti in precedenza. Nel caso dei pro-farmaci le conseguenze terapeutiche dei polimorfismi sono opposte a quelle osservate con i farmaci.

I polimorfismi del CYP2D6 influenzano la risposta terapeutica ad alcuni oppiacei orali

Esistono alcuni oppiacei orali impiegati nella terapia del dolore che sono in realtà dei pro-farmaci e che necessitano di una demetilazione in posizione 3 da parte del CYP2D6 per diventare attivi, cioè capaci di legare il recettore mu-oppioidi. Spiccano tra questi il tramadolo e la codeina. Nella figura 54.3 vengono mostrate le conseguenze farmacocinetiche della somministrazione di codeina a soggetti con 2 copie funzionali di CYP2D6 o con 0 copie di CYP2D6 a causa di CNV. La codeina è stata somministrata in singola dose orale e si è quindi misurata nel tempo la concentrazione di morfina in circolo, come conseguenza della demetilazione della codeina da parte del CYP2D6. Si evince chiaramente dalla figura che i portatori di 2 copie funzionali dell'enzima attivano il pro-farmaco mentre i portatori di CNV non presentano in circolo morfina, andando incontro a un fallimento terapeutico. Cosa potrebbe accadere in soggetti con CNV portatori da 3 a 13

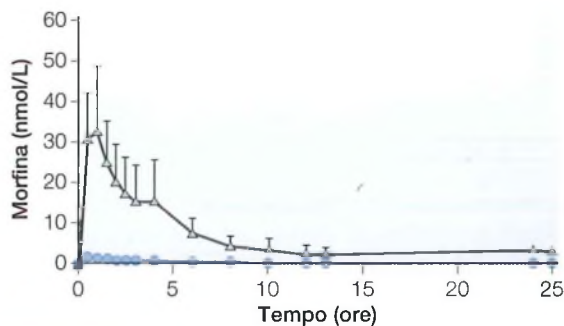


FIGURA 54.3 Attivazione della codeina a morfina in soggetti con 2 copie (triangoli) o 0 copie (pallini) di CYP2D6. Sull'asse delle y la concentrazione plasmatica di morfina; sull'asse delle x il tempo espresso in ore.

copie di CYP2D6? L'eccessiva conversione di codeina in morfina scatenerrebbe la rapida comparsa di eventi avversi che potrebbero consistere, per un basso numero di copie, in nausea e vomito fino all'insorgenza di allucinazioni, depressione respiratoria, coma, nel caso di un numero di copie elevato. Esistono numerose evidenze che questo tipo di reazioni avverse alla codeina e al tramadolo siano molto più frequenti nei portatori di CNV rispetto ai soggetti portatori di 2 copie di CYP2D6.

I polimorfismi del CYP2D6 influenzano la risposta al tamoxifene in donne con tumore della mammella

Il tamoxifene è un *Selective Estrogen Receptor Modulator* (SERM) che è impiegato nel trattamento farmacologico dei tumori della mammella. Anche in questo caso si tratta di un pro-farmaco che deve essere attivato nei due metaboliti 4-idrossi-tamoxifen ed endoxifen, attraverso l'azione del CYP2D6. È stato dimostrato che le donne con 0 o 1 copia funzionale del CYP2D6 presentavano una sopravvivenza libera da malattia ridotta rispetto alle donne con 2 o più alleli (Figura 54.4).

CYP2C19 e antiaggreganti piastrinici: il rischio di fallimenti terapeutici mortali

Un altro importante esempio di fallimento terapeutico determinato da mancata attivazione di un pro-farmaco riguarda il clopidogrel, un antiaggregante piastrinico utilizzato spesso in associazione con basse dosi di aspirina ad esempio in soggetti sottoposti ad angioplastica coronarica percutanea, per prevenire l'occlusione dello stent. Il clopidogrel è un profarmaco che dopo somministrazione orale viene rapidamente inattivato all'85% a livello epatico per l'azione di esterasi. Il restante 15% deve subire due fasi di reazioni di attivazione dove giocano un ruolo fondamentale diversi CYP, con particolare riferimento al CYP2C19 (Figura 54.5). Numerosi studi clinici hanno dimostrato che i portatori di varianti CYP2C19*2 e CYP2C19*3 possiedono una ridotta concentrazione

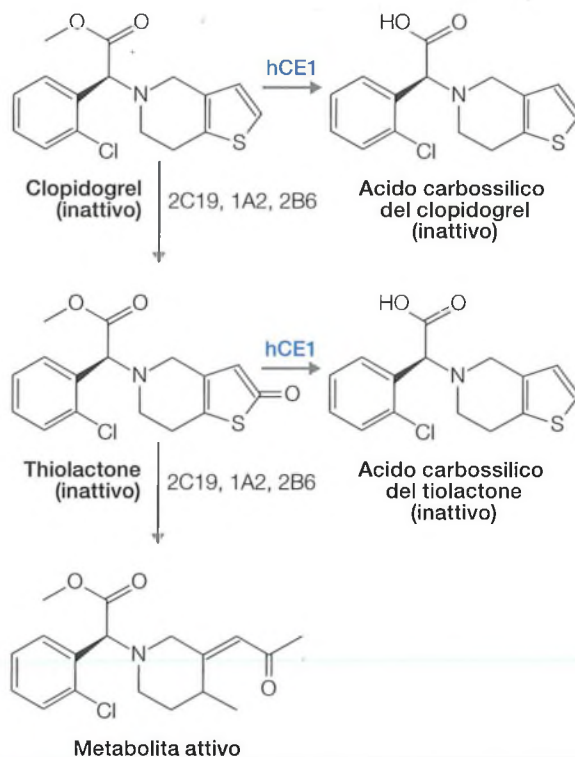


FIGURA 54.5 Metabolismo del clopidogrel. hCE1: *human Carboxil-Esterasi 1*.

plasmatica di metabolita attivo, hanno una maggiore reattività piastrinica e vanno incontro più frequentemente e in maniera statisticamente significativa a eventi cardiovascolari, quali la morte, l'infarto e l'ictus.

È interessante osservare che, invece, i portatori della variante CYP2C19*17, che codifica per un enzima più attivo, hanno un rischio minore di andare incontro a eventi cardiovascolari rispetto ai portatori della variante "normale" CYP2C19*1.

Molto recentemente, è stato dimostrato il coinvolgimento di un altro enzima nei processi di attivazione del clopidogrel, la paraoxonasi 1 (PON1), che presenta anch'essa varianti alleliche inattive che correlano con una ridotta risposta al farmaco. Quale sia l'esatto contributo di CYP2C19 e POX1 all'attivazione del farmaco rimane da essere chiaramente definito.

Il problema della mancata attivazione su base genetica del clopidogrel potrebbe comunque essere a breve risolto dalla utilizzazione in terapia di un nuovo antagonista del recettore P2Y12, il prasugrel, con la caratteristica saliente di non necessitare di alcuna attivazione da parte del CYP2C19.

Polimorfismi genetici nei geni codificanti per gli enzimi di fase II

La dimostrazione della correlazione esistente tra reazioni avverse all'isoniazide e differente capacità individuale di acetilare e quindi inattivare il farmaco costituisce certamente una pietra miliare nella storia della farmacogene-

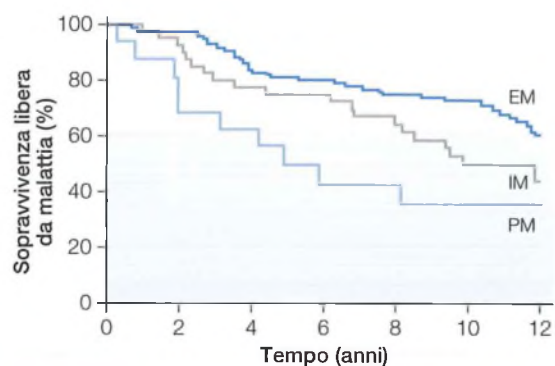


FIGURA 54.4 Contributo del numero di copie del CYP2D6 alla risposta terapeutica al tamoxifene in donne con tumore della mammella. Sull'asse delle y percentuale di donne trattate con tamoxifene che sopravvivono libere da malattia; sull'asse delle x il tempo espresso in anni. PM: *Poor Metabolizer* (0 copie o 1 copia di CYP2D6); IM: *Intermediate Metabolizer* (2 copie di CYP2D6); EM: *Extensive Metabolizer* (3 o più copie di CYP2D6).

TABELLA 54.4 Polimorfismi in alcuni geni codificanti enzimi di fase II e loro effetti molecolari e clinici

Enzima	Conseguenze molecolari dei più frequenti SNP	Conseguenze funzionali del SNP	Principali farmaci	Quadri clinici
Diidropirimidina deidrogenasi	Splicing aberrante	Enzima inattivo	5-Fluorouracile	Neurotossicità Mielosoppressione
Acetiltransferasi 2 (NAT2)		Ridotta attività enzimatica	Isoniazide Iralazina Procainamide	Neurotossicità
Glucuronosiltransferasi (UGT1A1)	Alterazioni a livello del promotore	Ridotta espressione	Irinotecano	Diarrea Mielosoppressione
Tiopurinametiltransferasi (TPMT)	Sostituzione amminoacidica	Enzima instabile	Mercaptopurina Azatioprina	Mielosoppressione

tica. Oltre all'enzima NAT2, i cui polimorfismi genetici sono appunto responsabili dell'esistenza di individui con capacità di acetilazione differenti, numerosi sono gli enzimi di fase II che presentano varianti alleliche nella popolazione (Tabella 54.4). Un ruolo centrale e, analogamente al CYP2D6, paradigmatico in farmacogenetica spetta però a un enzima i cui substrati endogeni sono pressoché sconosciuti e che è responsabile della metabolizzazione di un numero ridottissimo di farmaci: l'enzima tiopurinametiltransferasi (TPMT).

La tiopurinametiltransferasi: un altro paradigma in farmacogenetica

Le tiopurine sono tra i farmaci antineoplastici più diffusi che svolgono la loro azione farmacologica agendo come antimetaboliti purinici. Essi vengono somministrati come pro-farmaci, successivamente convertiti enzimaticamente in nucleotidi tioguaninici da parte dell'enzima ipoxantinafosforibosiltransferasi (HPRT) e quindi incorporati nel DNA dove interferiscono a vari livelli con la proliferazione cellulare. Non tutto il pro-farmaco somministrato viene però convertito in molecole farmacologicamente attive in quanto l'enzima TPMT compete con l'HPRT trasformando il pro-farmaco, mediante una S-metilazione, in un metabolita inattivo.

A questa classe di farmaci appartengono la mercaptopurina, un farmaco di prima linea nella terapia della leucemia linfoblastica acuta, la tioguanina, impiegata nella leucemie mieloblastiche, e la azatioprina, un farmaco immunosoppressore comunemente prescritto nella terapia di alcune malattie autoimmuni, ma anche per la profilassi del rigetto di trapianto d'organo. L'evento avverso più temibile causato dalle tiopurine è strettamente correlato al loro stesso meccanismo d'azione: una severa soppressione dell'attività ematopoietica midollare. Questo evento tuttavia non colpisce tutti i pazienti esposti al farmaco e, comunque, non con uguale gravità. La causa di questa variabilità individuale nello sviluppare mielosoppressione in risposta al trattamento con farmaci tiopurinici è stata identificata nell'esistenza di varianti alleliche non funzionanti del gene codificante per la TPMT. Sebbene siano noti numerosi polimorfismi a singolo nucleotide responsabili di altrettante varianti alleliche del gene, fondamentalmente soltanto tre di questi rendono conto per più del 90% delle varianti alleliche clinicamente rilevanti. Si tratta di polimorfismi delle regioni codificanti che de-

terminano sostituzioni amminoacidiche le quali, a loro volta, rendono l'enzima grandemente instabile e pronò a una rapida degradazione attraverso il proteasoma. Di fatto, la conseguenza di questi polimorfismi è l'assenza di attività enzimatica. È stato stimato che nei Caucasi circa il 10% degli individui è portatore di un allele inattivo, mentre 1 individuo su 300 è omozigote. Questi ultimi soggetti non mostrano alcuna attività dell'enzima TPMT a livello dei globuli rossi, dove l'enzima è normalmente espresso oltre che nel fegato e, se trattati con tiopurine, producono un'elevata quantità di nucleotidi tioguanilici, in quanto l'attività del HPRT non è controbilanciata da quella della TPMT. Questi pazienti, spesso bambini nel caso della leucemia linfoblastica acuta, vanno quasi ineluttabilmente incontro a severa mielosoppressione con grave rischio per la loro vita. È evidente che in questi pazienti si pone esclusivamente un problema di corretto dosaggio del farmaco, che può essere ridotto fino a un decimo di quello standard, con mantenimento dell'efficacia terapeutica ed eliminazione dell'evento avverso.

UGT1A1 e irinotecan: un caso già all'attenzione degli organismi regolatori

Un altro polimorfismo che ha trovato già applicazione nella pratica clinica riguarda l'enzima di fase II UGT1A1. Uno dei substrati dell'enzima è un farmaco antitumorale impiegato nel trattamento di numerosi tumori, come, ad esempio quelli del colon-retto: l'irinotecan.

L'irinotecan ha un complesso metabolismo, articolato in fasi di attivazione e inattivazione e il suo assorbimento e la sua distribuzione prevedono la partecipazione di diversi trasportatori. Un passaggio fondamentale che determina molto della tossicità del trattamento consiste nella glucuronidazione del metabolita attivo SN-38 da parte dell'enzima UGT1A1 a livello epatico che ne favorisce l'eliminazione per via biliare. Polimorfismi nel promotore del gene codificante per l'enzima ne riducono drasticamente la trascrizione e quindi l'espressione, esponendo i pazienti a elevatissimo rischio di sviluppare reazioni avverse gravi, quali leucopenia e diarrea di grado severo. Il test farmacogenetico dell'UGT1A1 per pazienti che devono intraprendere una terapia con irinotecan è suggerito sia da FDA che da EMA e i soggetti omozigoti per varianti responsabili di ridotta espressione dell'enzima dovrebbero essere trattati con dosaggi iniziali più bassi o non trattati con irinotecan.

Polimorfismi genetici nei geni codificanti trasportatori coinvolti nell'assorbimento, nella distribuzione e nell'eliminazione dei farmaci

Il passaggio dei farmaci attraverso le membrane biologiche è governato da precise leggi fisico-chimiche, ma può essere grandemente favorito o inibito dall'azione di specifici trasportatori di membrana. I trasportatori di membrana possono essere classificati in due superfamiglie: quella dei "solute carriers" (SLC) e quella degli ATP-binding-cassette (ABC) transporters.

Gli SLC sono stati classificati in 78 famiglie e sono codificati da circa 315 geni nell'uomo. Si tratta di molecole che trasportano diversi composti endogeni di natura ionica o non ionica, nonché alcuni farmaci e xenobiotici. Dal punto di vista energetico, garantiscono trasporti facilitati o trasporti attivi di secondo grado. I trasportatori ABC sono stati divisi in sette famiglie per un totale di 49 membri. I loro substrati condividono una struttura planare idrofobica con alcuni residui carichi positivamente o neutri. Questo significa che numerose molecole, sostanzialmente non correlate strutturalmente o farmacologicamente tra loro, possano essere attivamente trasportate. I trasportatori ATP garantiscono trasporti attivi di I grado con consumo di ATP.

ABC1 (MDR1 o P-glicoproteina): un protagonista nella realizzazione delle barriere biologiche

Uno dei membri della superfamiglia dei trasportatori ATP maggiormente studiato sia da un punto di vista farmacologico che farmacogenetico è ABC1, già noto come proteina responsabile della resistenza a numerosi farmaci (da qui MDR, cioè *Multi-Drug Resistance*) o P-glicoproteina.

ABC1 è espresso sulla membrana apicale degli enterociti, delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali, del tubulo renale, sulla faccia biliare degli epatociti, nella placenta. Il trasporto è unidirezionale, dall'interno all'esterno della cellula. È evidente quindi il ruolo di barriera e di difesa che il trasportatore svolge, contrastando il passaggio degli xenobiotici all'interno dell'organismo. A livello intestinale è espresso dal duodeno al retto ed è co-espresso con membri della famiglia del CYP3A, i quali contribuiscono a ridurre la biodisponibilità di numerosi farmaci, alcuni dei quali indicati nella tabella 54.5.

Più di 100 SNPs sono stati identificati nella regione codificante di ABC1, ma solo per alcuni di questi è nota la frequenza, essendo stati studiati per un loro potenziale impatto sulla risposta terapeutica. Tra questi, polimorfismo 3435C>3435T con la variante T che è presente tra i caucasici tra il 52% e il 57% sembrerebbe influenzare una diminuzione dell'espressione del trasportatore. Ad esempio, il genotipo TT correla con una aumentata concentrazione plasmatica della digossina e quindi con una maggiore probabilità di sviluppare tossicità. Tuttavia, l'esatto meccanismo molecolare attraverso il quale

questo polimorfismo potrebbe influenzare l'attività del trasportatore è poco chiaro. Infatti 3435C>3435T è un polimorfismo silente che non comporta quindi una variazione nella struttura primaria della proteina. È stato ipotizzato che il SNP potrebbe diminuire la stabilità dell'mRNA, ma le evidenze che supportino questa idea sono modeste. Una nuova affascinante ipotesi ha messo in luce come il nuovo codone che si viene a formare a causa del SNP codifichi sì per lo stesso amminoacido ma richiede la partecipazione di un tRNA molto raro. Questo rallenterebbe la traduzione e questa pausa consentirebbe al peptide di assumere conformazioni diverse che poi ne influenzerebbero l'attività. Quale che sia il meccanismo molecolare, numerosi sono i farmaci che sembrano essere influenzati da questo polimorfismo. Ad esempio, a livello della barriera ematoencefalica ABC1 limita il passaggio di alcuni farmaci antidepressivi come il citalopram. I portatori anche di uno solo dei due alleli T hanno una probabilità di remissione dalla malattia molto più elevata rispetto agli omozigoti C, a causa di un maggiore passaggio del farmaco nel sistema nervoso centrale.

Un polimorfismo nel trasportatore OAT1B1 correla con l'insorgenza di miopia indotta da statine

OAT1B1 è un trasportatore della famiglia degli SLC, implicato nel trasporto bidirezionale di numerosi farmaci tra i quali numerose statine. In uno studio "Genome-wide" nel quale si erano ricercati geni con varianti alleliche associate all'insorgenza di miopia e rhabdomiolisi in soggetti trattati con 80 mg di simvastatina, è emerso che un polimorfismo nella regione codificante di OAT1B1 correlava strettamente con la comparsa dell'evento avverso. Il trasportatore è localizzato sul versante ematico dell'epatocita e pompa il farmaco proveniente per via portale dall'intestino nell'epatocita stesso. Il polimorfismo causerebbe una drastica riduzione dell'attività del trasportatore e pertanto molto del farmaco entrerebbe nella circolazione sistemica, saltando il filtro epatico e accumulandosi nel muscolo scheletrico dove può causare effetti avversi.

TABELLA 54.5 Farmaci substrato del trasportatore ABC1

Classe	Farmaci trasportati
Farmaci antitumorali	Doxorubicina, imatinib, paxlitaxel, vinblastina, vincristina
Bloccanti canali al calcio	Diltiazem, verapamil
β-bloccanti	Bunitrololo, carvedilolo
Inibitori delle proteasi HIV	Indinavir, ritonavir
Antibiotici e antifungini	Eritromicina, levofloxacina, ketokonazolo
Ormoni	Testosterone, progesterone
Immunosoppressori	Ciclosporina, tacrolimus, sirolimus
Antiemetici	Ondansetron
Antistaminici	Terfenadina, fexofenadina
Miscellanea	Clopidogrel, digossina, loperamide

Polimorfismi genetici nei geni codificanti per i bersagli terapeutici primari dell'azione dei farmaci

La presenza di polimorfismi nei geni codificanti per i bersagli molecolari dell'azione dei farmaci, come recettori, canali ionici, enzimi, ha un enorme impatto sulla risposta individuale al trattamento farmacologico. Se i polimorfismi a carico dei geni codificanti per gli enzimi del metabolismo dei farmaci sembrano essere principalmente responsabili della comparsa di eventi avversi (ma non sempre, si pensi ai casi descritti dei pro-farmaci o dell'omeprazolo), quelli nei geni codificanti per i target terapeutici sembrano influenzare principalmente, ma non esclusivamente, l'efficacia del trattamento. Ad esempio, SNP non silenti delle regioni codificanti di un recettore a sette domini transmembrana possono determinare, a seconda della localizzazione della sostituzione amminoacidica nel contesto della proteina, modificazioni nell'affinità di agonisti e antagonisti, ridotto accoppiamento con le G-proteine, e quindi ridotta capacità di trasdurre il segnale, o anche aumentata internalizzazione da agonisti e quindi ridotta espressione sulla superficie delle cellule. Esistono attualmente numerosi casi ben caratterizzati di polimorfismi nei bersagli molecolari dei farmaci, alcuni dei quali sono indicati nella tabella 54.6.

Uno degli ambiti in cui la ricerca farmacogenetica ha prodotto i risultati più interessanti riguarda i recettori β -adrenergici, che hanno un notevole impatto sulla risposta a farmaci impiegati in cardiologia e pneumologia.

Un polimorfismo nei recettori $\beta 1$ è predittivo della risposta ai β -bloccanti in pazienti con scompenso cardiaco

I β -bloccanti sono farmaci di prima linea nella terapia dello scompenso cardiaco cronico, ma purtroppo esiste una marcata variabilità individuale negli esiti del trattamento terapeutico. I recettori $\beta 1$ possono essere presenti nella popolazione in alcune varianti alleliche, due delle quali sono determinate da un polimorfismo della regione codificante che causa in posizione 389 la presenza di una glicina (Gly) oppure di una arginina (Arg). Questa variazione della struttura primaria della proteina interessa una regione che è essenziale per l'interazione del recettore

con la proteina Gs. A conferma di ciò, studi funzionali in vitro hanno dimostrato che la variante Arg389 è molto più efficiente nella produzione di AMP ciclico rispetto alla variante Gly389.

In modelli sperimentali transgenici si è potuto dimostrare che la variante Arg389 conferisce uno stato di ipercontrattilità miocardica con una rapida evoluzione verso lo scompenso. Esistono numerose linee di evidenza nell'uomo che dimostrano che pazienti affetti da scompenso cardiaco con genotipo Arg389Arg, cioè omozigoti, hanno una peggiore evoluzione della malattia in termini di sopravvivenza rispetto ai soggetti Gly389Gly. In uno dei primi studi che hanno provato a correlare genotipo e risposta terapeutica ai β -bloccanti è stato osservato che in 224 pazienti con scompenso cardiaco trattati con il β -bloccante carvedilolo, i portatori del genotipo Arg389Arg rispondevano meglio al trattamento rispetto ai genotipi Gly389Gly, come confermato dalla misurazione della frazione di eiezione ventricolare sinistra. Non tutti gli studi che hanno direttamente comparato i 2 genotipi, utilizzando l'outcome clinico intermedio della frazione di eiezione ventricolare sinistra hanno però confermato questa associazione, forse anche perché β -bloccanti diversi venivano impiegati nei differenti studi.

Negli studi clinici che invece hanno considerato come outcome clinici, la morte, la ospedalizzazione per scompenso e la necessità di trapianto di cuore, i risultati più importanti si sono ottenuti quando nell'ambito di un medesimo genotipo, ad esempio Arg389Arg, si comparavano i soggetti trattati con β -bloccante con quelli non trattati (placebo) o trattati a basse dosi. Da questi studi è chiaramente emerso che i pazienti Arg389Arg traggono un grandissimo beneficio dal trattamento con β -bloccanti, mentre i Gly389Gly hanno un vantaggio ridotto, che potrebbe non giustificare l'uso di farmaci impegnativi dal punto di vista delle ADR e delle interazioni come i β -bloccanti, in favore di farmaci diversi.

Un'altra affascinante ipotesi che riguarda specificamente il carvedilolo e la migliore risposta clinica nei pazienti Arg389Arg è nata da studi di FRET (*Fluorescent Resonance Energy Transfer*) condotti per comprendere le dinamiche di attivazione e inibizione del recettore $\beta 1$. Da questi studi è emerso che il carvedilolo sui recettori Arg389 si comporta come un agonista inverso, mentre sui recettori Gly389 si comporta come antagonista. In contesto clinico, questo significherebbe che nei soggetti

TABELLA 54.6 Esempi di polimorfismi nei geni codificanti alcuni bersagli primari dell'azione dei farmaci e loro effetti clinici

Bersaglio primario	Farmaco	Risposta clinica determinata dal SNP
Promoter 5-lipoossigenasi	Zileuton	Mancata risposta nell'asma
Recettori dopaminergici D2 e D3	Antipsicotici	Insorgenza di discinesia tardiva
ACE	ACE-inibitori	Evoluzione nefropatia diabetica, ipertrofia ventricolare sinistra, disfunzione endoteliale
Recettore serotoninergico 5-HT 2C	Clozapina	Risposta nella schizofrenia
Recettore α per gli estrogeni	Estrogeni, SERM	Mineralizzazione ossea nella donna in post-menopausa
Recettori $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenergici	β -bloccanti broncodilatatori	Ridotta risposta, effetti avversi

Arg389Arg, il carvedilolo bloccherebbe l'attività basale che è particolarmente consistente nei recettori β_1 con variante Arg389, con un migliore controllo della frequenza e della contrattilità cardiaca.

I polimorfismi del recettore β_2 -adrenergico e la risposta ai trattamenti antiasma

Il recettore β_2 -adrenergico è prevalentemente espresso nella muscolatura liscia vasale e bronchiale dove, fisiologicamente, determina vasodilatazione e broncodilatazione in risposta alle catecolamine circolanti. Questo suo ruolo è stato sfruttato soprattutto nel trattamento dell'asma a diversa eziologia dove è diventato un bersaglio di elezione di numerosi farmaci agonisti.

Tre polimorfismi a singolo nucleotide sono stati identificati nella regione codificante i quali sono stati correlati ad alterata espressione, down-regulation o ridotto accoppiamento con la proteina Gs. In particolare sono stati studiati due SNPs che determinano in posizione 16 e 27 rispettivamente la sostituzione di una glicina (Gly) con una arginina (Arg) e di una glutamina (Gln) con un acido glutammico. In un recente studio, è stato osservato che gli individui omozigoti Arg16 sviluppavano completa desensitizzazione dei recettori β_2 , misurata come progressiva scomparsa di venodilatazione in seguito a infusione continua di isoproterenolo, viceversa i soggetti omozigoti Gly16 non mostravano alcuna modificazione della venodilatazione. Anche i polimorfismi del codone 27 sono rilevanti per la risposta agli agonisti: individui omozigoti Glu27 mostrano una più marcata venodilatazione da isoproterenolo rispetto agli individui omozigoti Gln27, indipendentemente dallo stato genotipico nel codone 16. Questi risultati correlano con altri studi che hanno dimostrato che la risposta terapeutica in pazienti asmatici in trattamento programmato e regolare con salbutamolo o salmeterolo subiva un graduale declino per la comparsa di frequenti esacerbazioni negli omozigoti Arg16 rispetto agli omozigoti Gly16, e che la cessazione della terapia provocava un deterioramento severo nei primi, ma non nei secondi. Questi dati sembrerebbero suggerire che il genotipo omozigote Arg16 potrebbe essere utilizzato per identificare pazienti ai quali non dovrebbero essere somministrati regolarmente agonisti β_2 -adrenergici. Tuttavia uno studio prospettico più recente sembrerebbe dimostrare che non vi siano variazioni nella risposta al salmeterolo, con o senza steroide associato, che possano essere spiegate sulla base del genotipo. Rimane pertanto da definire il contributo della farmacogenetica all'evoluzione della risposta terapeutica ai broncodilatatori, nella speranza che i soggetti che potrebbero sviluppare esacerbazioni, anche mortali, in seguito al trattamento con questi farmaci possano essere preventivamente identificati.

Modalità di studio in farmacogenetica

Negli ultimi quindici anni sono stati pubblicati numerosissimi studi farmacogenetici che purtroppo hanno

talvolta prodotto risultati conflittuali. In particolare, si è assistito alla pubblicazione di studi clinici diversi sul medesimo polimorfismo che arrivavano a conclusioni opposte sul ruolo di quella variante allelica nella risposta individuale al farmaco in esame. In altri casi, alcuni polimorfismi che, in studi in vitro, apparivano determinanti nel modificare le caratteristiche funzionali o l'espressione di una certa proteina coinvolta nella risposta a un trattamento farmacologico, si dimostravano completamente ininfluenti nei successivi studi clinici.

Queste grossolane discrepanze hanno generato, non senza fondamento, sospetti circa le capacità predittive della farmacogenetica; esse in realtà semplicemente riflettono la complessità delle basi genetiche di molti fenotipi in esame e l'inadeguatezza degli approcci metodologici per studiarli.

Per meglio comprendere questo concetto è opportuno illustrare come vengano condotti gli studi di farmacogenetica clinica.

Gli studi farmacogenetici possono essere di tipo diretto o indiretto

Uno studio farmacogenetico si propone di dimostrare che un determinato SNP (variante allelica) o un determinato aplotipo (cioè un blocco di SNPs) corredi con un determinato fenotipo nella risposta a un certo farmaco. Questi studi possono essere di tipo diretto o indiretto. Negli studi di tipo diretto vengono cercati polimorfismi a carico di specifici geni (ad esempio, recettori, enzimi del metabolismo), selezionati a priori sulla base di conoscenze farmacologiche, patogenetiche e fisiopatologiche che suggeriscono una possibile relazione causale con il profilo farmacogenetico in considerazione. Gli studi diretti sono studi di associazione allelica a gene candidato in cui si misura la frequenza di una variante allelica in soggetti che manifestino un certo tipo di risposta al farmaco, comparato a un gruppo di controllo. Gli studi che hanno portato all'identificazione delle varianti del CYP2D6 quali responsabili di eventi avversi o gli studi sulle varianti della TPMT correlate alla tossicità da anti-metaboliti purinici sono studi di questo tipo. Il vantaggio di questi studi è che se una chiara associazione è dimostrata, il gene responsabile del profilo farmacogenetico è immediatamente noto e utilizzabile in diagnostica. Tuttavia questi studi danno risultati univoci soltanto se il tratto farmacogenetico in esame ha basi monogeniche, cioè se è il risultato delle varianti alleliche di un unico gene. Purtroppo, la maggior parte dei fenotipi farmacogenetici è determinata da più di un gene con caratteristiche di trasmissibilità non facilmente descrivibili sulla base delle leggi di Mendel. Esistono due modelli, che non si escludono reciprocamente, per descrivere la complessità di queste situazioni: il modello "poligenico", secondo il quale il tratto farmacogenetico dipende da numerosi geni le cui varianti alleliche sono additive nel determinare un certo fenotipo, ma prese singolarmente hanno un modesto effetto quantitativo, e il modello "epistatico", secondo il quale tutte le varianti alleliche dei geni coinvolti devono essere presenti per determinare il fenotipo. Quale che

sia l'interpretazione più corretta, la conclusione comune delle due teorie è che, nelle situazioni non-mendeliane che sono le più frequenti, l'effetto del singolo gene sul profilo farmacogenetico è modesto e il rischio genotipico relativo basso e difficile da misurare.

La maggior parte degli studi farmacogenetici che hanno prodotto risultati conflittuali consideravano i polimorfismi di un unico gene per spiegare profili farmacogenetici multigenici.

Un approccio diretto più complesso è quello di considerare contemporaneamente i polimorfismi di un numero elevato di geni già noti per essere coinvolti in specifiche vie farmacologiche complesse. Ad esempio, per spiegare la mancata risposta farmacologica ai broncodilatatori si potrebbero contemporaneamente considerare le varianti alleliche dal recettore β_2 -adrenergico, della proteina G stimolatoria, dell'adenilatociclastasi, delle arginasi, della NOS, e via dicendo, cercando di correlare una particolare combinazione di polimorfismi sui diversi geni con lo specifico tratto farmacogenetico in esame. Alcuni di questi studi, in varie aree terapeutiche, sono stati già effettuati il più delle volte con risultati importanti, anche se spesso non definitivi.

Questo approccio è certamente più potente di un approccio a singolo gene candidato, ma è comunque limitato dal fatto di essere uno studio per ipotesi nel quale lo sperimentatore analizza, sulle base delle conoscenze a disposizione, soltanto alcuni geni escludendone altri che non sono ancora stati identificati o non sono noti essere coinvolti in una determinata risposta farmacologica.

Gli studi indiretti sono studi "genome-wide" e non richiedono alcuna conoscenza a priori sui geni o varianti alleliche associate a un determinato fenotipo. Possono avvalorarsi di specifici polimorfismi, spesso neutrali da un punto di vista funzionale perché localizzati nel DNA intergenico, la cui unica proprietà è quella di essere sufficientemente vicini a varianti alleliche responsabili di un certo profilo farmacogenetico. Tale vicinanza è responsabile del fatto che il sito polimorfico e l'allele che conferisce rischio per una determinata risposta farmacologica (o malattia, il criterio è identico) vadano difficilmente incontro a ricombinazione, un processo che accade durante la meiosi, e quindi vengano trovati frequentemente associati sullo stesso cromosoma nella popolazione. Il fenomeno per cui due loci raramente ricombinano è noto come "linkage disequilibrium" ed è indice della vicinanza tra i medesimi. È evidente che questo approccio indiretto prima di tutto necessita dell'identificazione di siti polimorfici uniformemente distribuiti in tutto il genoma umano. Era stato calcolato che fosse necessario identificare 500.000 siti polimorfici per potere esplorare l'intero genoma umano sfruttando il linkage disequilibrium. Il limite allo sviluppo di questi studi indiretti è stato soprattutto

rappresentato dai costi e dalla difficoltà di analisi dei dati. La nuova rivoluzione tecnologica che probabilmente darà enorme impulso agli studi indiretti in farmacogenetica è il "next generation sequencing". Si tratta di nuove piattaforme per il sequenziamento in parallelo degli acidi nucleici che può consentire il sequenziamento di milioni di basi in tempi molto brevi e a costi molto contenuti. Si stima che nel giro di qualche anno il sequenziamento di un intero genoma avverrà in qualche giorno al costo di circa 1000 dollari. Già oggi comunque i risultati sono impressionanti grazie al progetto "1000 genomi" e già al termine del 2011 si avranno informazioni di sequenza per 30.000 diversi genomi. Questo approccio non solo consentirà di identificare tutti i polimorfismi presenti nel DNA della nostra specie, ma consentirà di interrogare contemporaneamente il genoma di numerosi individui arruolati in studi nei quali tutti i geni componenti il genoma verranno presi in considerazione per il loro possibile contributo a un fenotipo patologico, sia esso malattia o alterata risposta a un trattamento farmacologico.

Il futuro della farmacogenetica

Allo stato attuale, la maggior parte delle informazioni farmacogenetiche ottenute è derivata da studi diretti e, in certi ambiti, i risultati di questo approccio si sono già tradotti in protocolli terapeutici, come nel caso delle terapie con warfarin e irinotecano. L'avvento del "next generation sequencing" promette di dare grande impulso agli studi indiretti, con la possibilità di spiegare profili farmacogenetici complessi attraverso l'identificazione di più geni che contribuiscono al fenotipo, molti dei quali potrebbero essere insospettiti. Laddove sarà dimostrato un chiaro ruolo dell'assetto genotipo del paziente, sarà possibile costruire kit diagnostici per l'identificazione preventiva di quegli individui che potrebbero non rispondere al trattamento, con costi e rischi legati alla non-terapia completamente evitabili, o che potrebbero soffrire di effetti avversi non tollerabili.

Le conseguenze di questa nuova modalità di prescrizione dei farmaci sono evidenti: una migliore qualità dell'intervento terapeutico, con una più razionale scelta della dose, un uso più sicuro dei farmaci da parte del Medico, che potrà richiedere la genotipizzazione del paziente in relazione a determinati trattamenti terapeutici così come oggi richiede i comuni esami del sangue, una più razionale e motivata ricerca per sviluppare strategie terapeutiche alternative al fine di curare coloro i quali non possano assumere uno specifico principio attivo, un risparmio di denaro dovuto all'eliminazione di terapie inefficaci e di ricoveri causati dagli effetti avversi dei farmaci.

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ L'assetto genotipico dei pazienti è una variabile fondamentale nella risposta individuale ai farmaci.
- ▶ La conoscenza del genotipo del paziente relativo a un determinato trattamento farmacologico, prima dell'inizio del trattamento, consente di limitare l'insorgenza di ADR e di fallimenti terapeutici, nonché di risparmiare denaro che può essere reinvestito nella ricerca di nuovi farmaci.
- ▶ Molte delle differenze genotipiche che influenzano la sensibilità alla terapia sono a carico di enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci.

Bibliografia essenziale

- ▶ Crettol S, Petrovic N, Murray M. Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Curr Pharm Des* 2010;16:204-19.
- ▶ He Y, Hoskins JM, McLeod HL. Copy number variants in pharmacogenetic genes. *Trends Mol Med* 2011;17:244-51.
- ▶ Johnson JA, Liggett SB. Cardiovascular pharmacogenomics of adrenergic receptor signaling: clinical implications and future directions. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:366-78.
- ▶ Wang L, McLeod HL, Epub 2011 Mar 8.
- ▶ Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med* 2011;364:1144-53.
- ▶ Zhang W, Dolan ME. Impact of the 1000 genomes project on the next wave of pharmacogenomic discovery. *Pharmacogenomics* 2010;11:249-56.

Interazioni tra farmaci

Achille P. Caputi, Giuseppina Fava, Angela De Sarro

Obiettivi formativi

- Conoscere se quando si assumono due o più farmaci insieme (anche insieme a rimedi erboristici e/o alimenti) si possa determinare una interazione tra di loro
- Comprendere se dall'interazione possa nascere un aumento o una riduzione degli effetti di uno dei farmaci, anche in termini di durata
- Conoscere quale sia la componente dell'insorgenza di eventi avversi dovuta alle interazioni tra farmaci
- Apprendere quali siano le avvertenze e gli accorgimenti per evitarli

Nella pratica clinica l'uso contemporaneo di più farmaci (polifarmacoterapia) è spesso necessario per il raggiungimento del risultato terapeutico desiderato in molte patologie (ad esempio, ipertensione, AIDS, insufficienza cardiaca, neoplasie ecc.).

In questi ultimi anni c'è stato un grande aumento del numero di farmaci assunti da ciascun paziente e si calcola che negli USA e in Europa uno su dieci pazienti assuma più di cinque farmaci contemporaneamente.

È noto che la contemporanea assunzione di più farmaci può produrre interazioni di diversa natura.

Il verificarsi di una interazione non implica necessariamente che i farmaci siano stati co-somministrati. Infatti, un farmaco può condizionare la risposta dell'organismo a un altro farmaco assunto successivamente. Quanti più farmaci vengono assunti dal paziente, tanto maggiore sarà la probabilità che si verifichi un'interazione, i cui effetti, data la grande variabilità nella risposta individuale, non sono facilmente quantificabili.

Vi sono interazioni i cui effetti si rivelano positivi sotto il profilo clinico e quindi utili ai fini terapeutici (Tabella 55.1).

Vi sono interazioni i cui effetti sono clinicamente irrilevanti. Vi sono, infine, interazioni che producono risposte eccessive e/o inadeguate ai fini terapeutici (Tabella 55.2).

Il rischio di reazioni avverse, conseguenti a interazioni tra farmaci, aumenta notevolmente in caso di farmaci responsabili di importanti effetti tossici e con basso indice terapeutico, e ancora in particolari categorie di pazienti come, ad esempio, quelli affetti da patologie croniche sottoposti a terapie prolungate, quelli ricoverati in terapia intensiva e i soggetti trapiantati.

Farmaci spesso coinvolti in interazioni clinicamente rilevanti sono gli anticoagulanti, gli antiaritmici, gli anticonvulsivanti, gli antidepressivi, alcuni antibatterici e antifungini, i farmaci antiretrovirali, diversi antineoplastici e immunosoppressori. Nel valutare gli effetti di una interazione, è importante considerare alcuni fattori:

- caratteristiche del paziente (ad esempio, gli anziani sono più esposti al rischio di interazioni, poiché spesso sono in politerapia per comorbidità);
- anamnesi farmacologica (il rischio di interazioni può anche essere correlato al numero dei medici prescrittori o anche all'assunzione arbitraria di farmaci (prodotti da banco) o di altre sostanze (fitoterapici, integratori).

TABELLA 55.1 Esempi di associazioni utilizzate ai fini terapeutici

Farmaci	Indicazione clinica
β-lattamici e aminoglicosidi	Infezioni batteriche
Inibitori della trascrittasi e inibitori delle proteasi	AIDS
FANS e codeina	Dolore
Diuretici e β-bloccanti, ACE-inibitori, Ca-antagonisti	Iperensione arteriosa
β ₂ -agonisti e corticosteroidi, anti-muscarnici, antagonisti dei leucotrieni	Asma bronchiale
Corticosteroidi e tacrolimus, micofenolato, azatioprina	Malattie autoimmuni e trapianto
Antimetaboliti e alchilanti, antracicline	Neoplasie
L-Dopa e inibitori della dopa-decarbossilasi, inibitori della Mao-B, antimuscarinici	Morbo di Parkinson
Carbamazepina e fenitoina, valproato	Epilessia

TABELLA 55.2 Esempi di associazioni che possono produrre risposte eccessive o inadeguate ai fini terapeutici

Antiacidi e fluorochinoloni	Riduzione dell'assorbimento intestinale dell'antibiotico	Ridotto effetto antibatterico
Antiacidi e ketoconazolo		Ridotto effetto antimicotico
Ampicillina ed estrogeni	Interruzione del circolo enteroepatico degli estrogeni	Rischio di gravidanza
FANS e glucocorticoidi	Aumento degli effetti lesivi a carico della mucosa gastrica	Emorragia gastrica
FANS e metotrexate	Aumento dei livelli plasmatici del metotrexate	Possibile aumento della tossicità del metotrexate
FANS e β -bloccanti	I FANS inibiscono la sintesi di prostaglandine a livello renale	Riduzione dell'effetto antipertensivo dei β -bloccanti e degli ACE-inibitori
FANS e ACE-inibitori		
Eritromicina e warfarin	Inibizione della biotrasformazione	Rischio di emorragia
Eritromicina e ciclosporina		Rischio di tossicità renale
Ketoconazolo e warfarin	Inibizione della biotrasformazione	Rischio di emorragia
Ketoconazolo e ciclosporina		Rischio di tossicità renale
Rifampicina e warfarin	Inibizione della biotrasformazione	Ridotto effetto anticoagulante
Rifampicina e contraccettivi orali		Rischio di gravidanza
Aspirina e warfarin	Potenziamento dell'effetto anticoagulante del warfarin	Rischio di emorragia
Statine e fibrati	Potenziamento della tossicità muscolare	Rischio di rabdiomiolisi

In generale, le interazioni tra farmaci, in base ai meccanismi responsabili, vengono distinte in *farmacocinetiche* e *farmacodinamiche* (Figura 55.1).

Interazioni farmacocinetiche

I farmaci possono interagire a qualsiasi livello durante i processi di assorbimento (il calcio e altri cationi interferiscono con l'assorbimento di altri farmaci), distribuzione (spiazzamento dal legame con le proteine plasmatiche di un farmaco da parte di un altro farmaco con maggiore affinità), biotrasformazione (induzione e inibizione del metabolismo di un farmaco a opera di un altro), escrezione (competizione tra farmaci nel processo di secrezione tubulare) (Tabella 55.3).

Interazioni in fase di assorbimento

Assorbimento orale

Diverse sono le modalità mediante le quali un farmaco può interferire con l'assorbimento di un altro farmaco lungo il tratto gastrointestinale. La biodisponibilità di numerosi farmaci assunti per via orale può, inoltre, essere influenzata dalla presenza o meno di cibo.

Modificazioni del pH gastrico

Antiacidi e inibitori della secrezione gastrica (farmaci anti- H_2 e inibitori della pompa protonica) possono (innalzando il pH gastrico) modificare il grado di ionizzazione e di liposolubilità di altri farmaci, alterandone così l'assorbimento. Farmaci acidi come i salicilati, alcuni antibiotici (fluorochinoloni) e antimicotici (ketoconazolo) sono assorbiti in minore misura in caso di pH gastrico elevato, per cui ne consegue un ridotto effetto terapeutico (Tabella 55.2). Viceversa, l'aumento del pH gastrico, favorisce l'assorbimento di farmaci basici, come alcuni antidiabetici (tolbutamide), potenziandone gli effetti.

Neutralizzazione

La neutralizzazione (vedi anche *incompatibilità*) è una reazione chimico-fisica tra due farmaci, che si verifica lungo il tratto gastroenterico prima dell'assorbimento, e che porta alla formazione di chelati e di complessi non assorbibili. Antiacidi, come l'idrossido di magnesio o di alluminio, o i sali di ferro, chelano le tetraciline riducendone così l'assorbimento. Analogamente la colestiramina, una resina a scambio ionico, adsorbe diversi farmaci, come warfarin, digitale e tiroxina, impedendone l'assorbimento. Bifosfonati e sali di calcio, spesso associati nel trattamento dell'osteoporosi, se assunti contemporaneamente possono l'uno ridurre la biodisponibilità dell'altro con il rischio di un fallimento terapeutico (Tabella 55.3).

Modificazioni del transito gastrointestinale

Le modificazioni della motilità gastrointestinale indotte da alcuni farmaci possono ripercuotersi sulla velocità e/o sull'entità dell'assorbimento di un altro farmaco (biodisponibilità assoluta). Una ridotta velocità dello svuotamento gastrico, o una ridotta motilità intestinale causata da agonisti oppioidi (morfina, loperamide), o da farmaci con attività anticolinergica (atropina, antistaminici, fenotiazine) possono rallentare l'assorbimento di


FIGURA 55.1 Classificazione delle interazioni farmacologiche.

TABELLA 55.3 Esempi di interazioni farmacocinetiche

Farmaco A		Farmaco B	Effetti su B
<i>In fase di assorbimento</i>			
Colestiramina	+	Digitale	Ridotta biodisponibilità
Sali di calcio	+	Bifosfonati	
<i>In fase di distribuzione</i>			
Fenilbutazone	+	Warfarin	Potenziamento (spiazzamento)
Chinidina	+	Digossina	
<i>In fase metabolica</i>			
Cimetidina	+	Warfarin	Potenziamento (inibizione enzimatica)
Ketoconazolo	+	Ciclosporina	
Fenobarbital	+	Fenitoina	Riduzione (induzione enzimatica)
Rifampicina	+	Tacrolimus	
<i>In fase di eliminazione</i>			
Probenecid	+	Penicillina	
Salicilati	+	Metotrexate	Potenziamento
Diuretici tiazidici	+	Carbonato di litio	

altri farmaci (macrolidi). Viceversa, un'accelerazione dello svuotamento gastrico, indotta da farmaci procinetici (metoclopramide, domperidone), può favorire l'assorbimento di farmaci assorbiti prevalentemente nel primo tratto dell'intestino.

Alterazioni della mucosa gastrointestinale

Alcuni farmaci dotati di tossicità gastrointestinale specifica (antitumorali) possono provocare stati di malassorbimento riducendo così in maniera spesso significativa la biodisponibilità di altri.

Inibizione della flora batterica intestinale

Alterazioni della flora batterica intestinale rappresentano un ulteriore meccanismo mediante il quale alcuni farmaci possono ostacolare l'assorbimento di altri. L'assunzione per via orale di antibatterici soprattutto quelli ad ampio spettro, causa di solito una riduzione della normale flora batterica intestinale. Ciò può indirettamente potenziare gli effetti di farmaci, quali la digossina e la levodopa, essendo questi largamente metabolizzati dalla flora batterica intestinale. Di contro, sempre gli antibiotici possono inibire l'attività idrolitica che i batteri intestinali esercitano sui metaboliti di alcuni farmaci riversati con la bile in forma coniugata nell'intestino (etinilestradiolo). Ciò comporta un ridotto riassorbimento intestinale del farmaco in forma attiva (circolo enteroepatico) e, di conseguenza, anche un possibile fallimento terapeutico (effetto anticoncezionale) (Tabella 55.2).

Interazioni in fase di distribuzione

Spiazzamento dei farmaci dai siti di legame con le proteine plasmatiche

Molti farmaci si legano alle proteine plasmatiche in maniera reversibile. Si stabilisce così un equilibrio tra la quota legata e quella libera del farmaco. Può succedere che in funzione della concentrazione e dell'affinità relativa per i

siti di legame, un farmaco possa competere con successo con un altro e spiazzarlo da tali siti. Le molecole "spiazzate", divenute perciò libere e quindi attive, si immettono nella componente acquosa del plasma, dove la loro concentrazione cresce, in tal modo, rapidamente. Così, ad esempio, un farmaco il cui legame alle proteine plasmatiche si riduca dal 99 al 95%, subisce un incremento di concentrazione della forma libera e attiva dall'1 al 4% (cioè di quattro volte). Lo spiazzamento fa aumentare in modo significativo le molecole libere e attive solo se la maggior parte del farmaco si trova nel plasma, piuttosto che nei tessuti; quindi solamente farmaci con un basso volume apparente di distribuzione si comportano in questo modo. È il caso delle sulfaniluree come la tolbutamide (96% legata, $V_d = 10$ litri), gli anticoagulanti orali come il warfarin (99% legato, $V_d = 9$ litri) e la fenitoina (90% legata, $V_d = 35$ litri).

Pertanto, sebbene molti farmaci siano potenzialmente in grado di interagire tra di loro con tali modalità, in realtà esistono pochi esempi di questo tipo di interazione che abbiano una certa rilevanza. In molti casi, il fenomeno è spesso transitorio e riveste importanza clinica soltanto in caso di spiazzamento di farmaci il cui legame alle proteine plasmatiche superi abitualmente il 90-95% e di farmaci con basso indice terapeutico.

In questi casi l'aumento della quota libera circolante può determinare la comparsa di reazioni avverse anche molto gravi.

Un tipico esempio è costituito dalla comparsa di emorragia in corso di terapia con il warfarin in un paziente che abbia assunto contemporaneamente un FANS.

Esistono ancora altre condizioni in cui farmaci in grado di alterare il legame di altri alle proteine plasmatiche possono, non solo spiazzarli, ma anche inibirne la biotrasformazione o l'eliminazione. Il fenilbutazone, ad esempio, spiazza il warfarin dai siti di legame sull'albumina e allo stesso tempo inibisce selettivamente il metabolismo del suo isomero farmacologicamente attivo S, prolungando il tempo di protrombina e causando un aumento del sanguinamento. I salicilati spiazzano il metotrexate dai siti di legame dell'albumina e ne riducono anche la secrezione renale competendo per il sistema di trasporto tubulare (vedi CD: Approfondimento 55.1. La glicoproteina P e i trasportatori di anioni e cationi coinvolti nelle interazioni tra farmaci e Tabelle 55.2 e 55.3). La chinidina e numerosi altri antiaritmici, tra cui verapamil e amiodarone spiazzano la digossina dai siti di legame tissutali e, allo stesso tempo, ne riducono la secrezione renale, favorendo, così, l'insorgenza di aritmie da digossina.

Interazioni in fase di biotrasformazione

Le interazioni tra farmaci in fase di biotrasformazione sono abbastanza numerose e alcune clinicamente molto importanti.

Induzione e inibizione enzimatica

Le interazioni che si verificano durante i processi di biotrasformazione dei farmaci possono determinare un

incremento oppure una riduzione della quota di farmaco attivo attraverso reazioni di induzione o di inibizione degli enzimi farmacometabolici (Figura 55.2 e Tabella 55.3) (vedi anche Capitolo 52 e **CD**: Approfondimenti 52.1; 52.2; 52.3).

Benché diversi tessuti siano in grado di metabolizzare i farmaci, l'organo considerato principalmente responsabile è il fegato e con esso il citocromo P450 (CYP450) di cui si conoscono differenti isoenzimi o isoforme (circa 100) derivanti da geni distinti. A tutt'oggi sono stati identificati nei mammiferi almeno 14 famiglie di geni, anche se principalmente tre (CYP1, CYP2 e CYP3) assumono un ruolo determinante nel metabolismo dei farmaci. Il CYP450, oltre a essere largamente presente negli epatociti, si ritrova anche in altri tessuti, quali gli enterociti del piccolo intestino, i reni, i polmoni, il cervello. La sottofamiglia CYP3A4 è l'isoenzima maggiormente espresso sia a livello epatico (circa il 60%), che a livello del piccolo intestino (circa il 70%). Altri isoenzimi largamente implicati nel metabolismo dei farmaci sono il 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 1A1, 1A2 (Figura 55.3). Essi differiscono per sequenza di amminoacidi, per specificità delle reazioni catalizzate e per regolazione da parte di inibitori e induttori (Figura 55.3 e Tabella 55.4). Gli inibitori, a loro volta, si diversificano nella selettività per le varie isoforme dell'enzima e si distinguono in base al meccanismo d'azione (competitivi e non competitivi).

Nel caso di due o più farmaci substrati dello stesso isoenzima questi possono competere per lo stesso sito di legame, per cui sarà il farmaco con minore affinità a subire una riduzione del suo metabolismo. Altri farmaci, invece, competono con il sito attivo, pur non essendo essi stessi substrati (ad esempio, la chinidina, un potente inibitore competitivo del CYP2D6, non è un suo substrato). Tra gli inibitori non competitivi vi è, ad esempio, il ketoconazolo che legandosi all'eme della forma Fe^{3+} del CYP3A4 ne determina l'inibizione reversibile.

Analogamente si comporta l'eritromicina in grado di inibire sia l'isoforma CYP3A4 che quella CYP1A2 sotto

il cui controllo è l'inattivazione di numerosi farmaci. Di conseguenza, la risposta al farmaco potrà essere più prolungata e più intensa o addirittura eccessiva (comparsa di manifestazioni tossiche). Di notevole interesse, dal punto di vista clinico, sono le interazioni tra eritromicina e cisapride o terfenadina (substrati del CYP3A4) e tra eritromicina e triazolam (substrato del CYP1A2). Nel primo caso (cisapride o terfenadina) l'interazione con l'eritromicina può causare una grave forma di tachicardia ventricolare, mentre nel secondo caso (triazolam) può determinarsi uno stato di marcata sedazione (Tabella 55.4).

In anni recenti sia la terfenadina che la cisapride sono stati ritirati dal mercato proprio in seguito a segnalazioni di gravi episodi di cardiotoxicità, alcuni addirittura fatali, in pazienti trattati contemporaneamente con eritromicina o antifungini azolici.

La cimetidina inibisce sensibilmente gli enzimi microsomiali epatici, potenziando così gli effetti di diversi farmaci tra cui le benzodiazepine, la carbamazepina, il warfarin e la teofillina.

Altro esempio classico e rilevante è rappresentato dagli antidepressivi inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) che inibiscono il metabolismo di molti farmaci. Gli SSRI inibiscono la conversione della codeina a morfina e quindi diminuiscono l'efficacia analgesica di questo farmaco e ne favoriscono l'accumulo dell'organismo. Essi inoltre diminuiscono l'azione terapeutica del tamoxifene nella terapia del tumore della mammella cosicché pazienti che assumono ambedue questi farmaci hanno una probabilità maggiore del 50% di morire di cancro rispetto a pazienti che assumano solo tamoxifene. Alcuni farmaci e xenobiotici (ad esempio, fenobarbitale, carbamazepina, fenitoina, rifampicina, etanolo, fumo di sigaretta), invece, inducono, sia a livello epatico che extraepatico il CYP450. I pazienti con dipendenza da etanolo (induttore degli isoenzimi CYP1A2 e CYP2E1) sono soggetti a elevato rischio di epatotossicità da metaboliti tossici del paracetamolo (substrato di CYP1A2). Il fumo di sigaretta (benzopirene) può indurre il metabolismo di

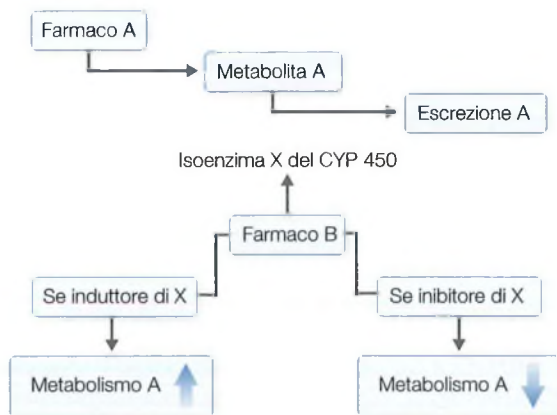


FIGURA 55.2 Rappresentazione schematica delle interazioni tra farmaci in fase di biotrasformazione. L'induzione o l'inibizione dell'attività del citocromo P450 da parte del farmaco B possono modificare il metabolismo del farmaco A, accelerandolo o rallentandolo.

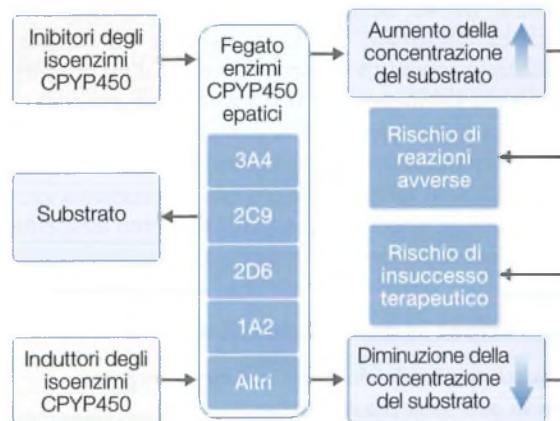


FIGURA 55.3 Conseguenze cliniche prodotte dall'induzione o dall'inibizione del citocromo P450.

TABELLA 55.4 Alcuni induttori, inibitori e substrati delle principali isoforme del CYP450 coinvolte nel metabolismo dei farmaci

Isoenzimi	Induttori	Inibitori	Substrati
CYP1A2	Carbamazepina Fenobarbital Rifampicina Fumo di sigaretta (benzopirene) Etanolo	Fluoxamina Eritromicina Claritromicina	Paracetamolo Teofillina Tacrina Clozapina Amitriptilina Fluoxamina
CYP2C8			Tassolo
CYP2C9	Carbamazepina Fenobarbital Fenitoina Rifampicina	Amiodarone Fluconazolo Fluoxamina Acido valproico	Ibuprofen Diclofenac Celecoxib Fenitoina Tolbutamide Warfarin Losartan
CYP2C19	Carbamazepina Fenobarbital Fenitoina Rifampicina	Felbamato Fluoxamina Omeprazolo Ticlopidina	Omeprazolo Imipramina Citalopram Fenitoina Diazepam Warfarin
CYP2D6	Etanolo Isoniazide	Disulfiram	Etanolo Alotano Isoniazide Felbamato Fenobarbital Metossifurano
CYP3A4	Carbamazepina Fenobarbital Fenitoina Rifampicina Iperico	Fluoxamina Eritromicina Ritonavir Indinavir Itraconazolo Ketoconazolo Succo di pompelmo	Carbamazepina Midazolam Imipramina Clozapina Nifedipina Diltiazem Verapamil Ciclosporina Tacrolimus Cisapride Terfenadina Eritromicina Claritromicina Tamoxifene Amiodarone Chinidina Itraconazolo Ketoconazolo Ritonavir Indinavir

substrati del CYP1A2 quali la clozapina, la fluoxamina, la teofillina o la caffeina (Tabella 55.4).

Altri, ancora, come gli inibitori delle proteasi, si comportano in alcuni casi da induttori, in altri da inibitori enzimatici. In particolare, il ritonavir è fra tutti il composto che interagisce con il maggior numero di enzimi (induce l'isoforma 1A2, mentre, inibisce fortemente l'isoforma 3A4 e moderatamente le isoforme 2D6, 2C9/10 e 2C19) e dunque è potenzialmente l'esponente responsabile delle interazioni più numerose.

Un altro caso abbastanza interessante è il diverso comportamento dei farmaci inibitori della COX-2, rofecoxib e celecoxib. Questi sono metabolizzati diversamente a livello epatico e, precisamente, il rofecoxib soprattutto per riduzione da parte degli enzimi citosolici, il celecoxib, invece, dal CYP2C9, per cui quest'ultimo può risentire

degli effetti sia di inibitori che di induttori del CYP2C9. Inoltre, il celecoxib inibisce il CYP2D6 per cui può modificare le concentrazioni di quei farmaci substrato del CYP2D6 (antidepressivi, antipsicotici) (Tabella 55.4). Concludendo, le conseguenze più importanti della induzione degli enzimi CYP450 nella terapia farmacologica possono essere: una riduzione degli effetti farmacologici in seguito a un incremento del metabolismo del farmaco; una diminuzione della tossicità, attraverso una detossificazione più rapida, o un aumento della tossicità, in seguito alla maggiore produzione di metaboliti reattivi (come nel caso del paracetamolo o di alcuni idrocarburi policiclici) (Figura 55.3).

A differenza dell'inibizione, che promuove una risposta quasi immediata, l'induzione è un processo lento, che può ridurre la concentrazione plasmatica di un farmaco e, di conseguenza, comprometterne l'efficacia, in maniera tempo-dipendente. L'induzione enzimatica prevede infatti un aumento della trascrizione genica e quindi della sintesi degli enzimi microsomiali, come risposta adattativa che protegge le cellule, ad esempio in presenza di xenobiotici tossici (benzopirene), aumentandone l'attività detossificante. È in un certo senso difficile predire i tempi richiesti affinché si verifichi l'induzione di un enzima. Diversi fattori, inclusi l'emivita del farmaco e il turnover dell'enzima, possono infatti concorrere nel suo determinismo.

Tra le sostanze presenti negli alimenti o nelle piante in grado di influenzare l'attività degli enzimi CYP450 e anche della glicoproteina P (P-gp) (vedi **CD**: Approfondimento 55.1) vi sono l'iperico e il succo di pompelmo (Tabelle 55.4 e 55.5). L'estratto di iperico (o erba di S. Giovanni) è un farmaco da banco che molti pazienti si autoprescrivono per il trattamento di sintomi depressivi. Si è visto che è in grado di ridurre i livelli plasmatici di diversi farmaci quali warfarin, digossina, teofillina, contraccettivi orali, indinavir e ciclosporina, inducendo sia a livello epatico che intestinale il CYP3A e, a concentrazioni clinicamente rilevanti, anche la P-gp (Tabella 55.5).

Il succo di pompelmo interagisce con calcio-antagonisti, statine e ciclosporina ma, a differenza dell'iperico, aumentandone i livelli plasmatici. Anche in questo caso, studi sperimentali hanno dimostrato un'interazione (inibizione) con il CYP3A4 e con la P-gp intestinale (Tabelle 55.4 e 55.5 e vedi **CD**: Approfondimento 55.2. *Interazioni tra farmaci e alimenti*).

TABELLA 55.5 Esempi di substrati, inibitori e induttori della glicoproteina-P

Substrati	Induttori	Inibitori
Digossina Diltiazem Nifedipina Warfarin Indinavir Nelfinavir Morfina Ciclosporina Contraccettivi orali	Rifampicina Fenobarbital Midazolam Nifedipina Iperico	Chinidina Verapamil Ciclosporina Amiodarone Ketoconazolo Itraconazolo Eritromicina Claritromicina Azitromicina Succo di pompelmo

Altra interazione di tipo metabolico importante sotto il profilo tossicologico è quella tra l'allopurinolo, inibitore della xantinossidasi e perciò utilizzato nel trattamento della gotta, e la 6-mercaptapurina. Quest'ultima, infatti, viene metabolizzata dalla xantinossidasi e l'allopurinolo, ne prolunga e potenzia gli effetti, aumentando in tal modo il rischio di tossicità.

Vi sono, invece, alcune interazioni tra farmaci espressamente sfruttate a fini terapeutici. Per esempio, nella terapia del morbo di Parkinson, alla levodopa si associa quasi sempre la benserazide che, essendo un inibitore della dopa-decarbossilasi periferica, ostacola il metabolismo periferico della levodopa, rendendola così maggiormente disponibile a livello del sistema nervoso centrale e consentendo una riduzione della posologia e con essa degli effetti collaterali periferici (Tabella 55.1).

Modificazioni del flusso ematico epatico

Un certo numero di farmaci molto liposolubili (lidocaina) subiscono una sostanziale biotrasformazione intestinale ed epatica (*effetto di primo passaggio*). Durante tale processo può succedere che alcuni farmaci influenzino il metabolismo di primo passaggio di altri. Un esempio è rappresentato dall'aumento dei livelli plasmatici della lidocaina dovuto alle variazioni del flusso sanguigno epatico indotto dai β -bloccanti nei cardiopatici.

Interazioni in fase di escrezione

Un farmaco può influenzare significativamente l'escrezione renale di un altro farmaco mediante:

- alterazione del suo legame alle proteine, e quindi del grado di filtrazione;
- inibizione della secrezione tubulare;
- alterazione del flusso ematico renale, del pH urinario e del bilancio idroelettrolitico.

Farmaci che utilizzano lo stesso sistema di trasporto attivo (vedi CD: Approfondimento 55.1) nei tubuli renali possono competere tra loro per l'escrezione. L'esempio più significativo è rappresentato dal probenecid che, inibendo la secrezione tubulare della penicillina e di altri farmaci, ne riduce le concentrazioni urinarie, aumentando quelle plasmatiche. Analogamente, i salicilati e altri FANS possono ostacolare l'escrezione renale del metotrexate con grave rischio di tossicità (Tabella 55.2). Anche l'aumento delle concentrazioni sieriche di digossina da parte dell'azitromicina (che diversamente dall'eritromicina non influenza in maniera rilevante l'attività del CYP450 a livello epatico) sembra essere dovuto piuttosto a una ridotta secrezione tubulare del glucoside mediata dalla P-gp a livello renale (Tabella 55.5).

Le modificazioni del pH urinario possono influire sullo stato di ionizzazione dei farmaci, condizionandone il riassorbimento da parte del tubulo renale. Quindi cambiamenti del pH urinario che incrementino la quantità di farmaco in forma ionizzata (urine alcaline per farmaci acidi, urine acide per le basi) aumentano la perdita di farmaco, mentre cambiamenti del pH che favoriscano

l'accumulo del farmaco in forma indissociata nell'urina ne incrementano il riassorbimento tubulare. Così, in presenza di farmaci alcalinizzanti, come il bicarbonato di sodio, gli acidi deboli, quali i barbiturici, risultano più dissociati, mentre, in presenza di farmaci acidificanti, come il cloruro d'ammonio, risultano più dissociate le basi deboli, come le amfetamine.

L'effetto prodotto dalle variazioni del pH urinario sull'escrezione di acidi e basi deboli viene sfruttato nel trattamento degli avvelenamenti, come nel caso dei barbiturici.

I farmaci diuretici tendono ad aumentare l'escrezione di vari farmaci, ma questo effetto raramente assume importanza clinica. I diuretici tiazidici e dell'ansa, tuttavia, aumentano indirettamente il riassorbimento di Li^+ a livello del tubulo prossimale e ciò potrebbe tradursi in aumentato rischio di tossicità nei pazienti in terapia con carbonato di litio. I diuretici depletori di potassio possono, nel ridurre la concentrazione plasmatica del K^+ , determinare una situazione di esaltata sensibilità miocardica ai glucosidi digitatici con conseguente tossicità.

Interazioni farmacodinamiche

Le interazioni farmacodinamiche possono ricondursi a più meccanismi e in base agli effetti possono essere definite additive, sinergiche o antagoniste. I farmaci possono competere per l'occupazione di siti recettoriali comuni (interazione diretta) o di sistemi recettoriali o fisiologici differenti (interazione indiretta) promuovendo effetti simili oppure contrari (Tabella 55.6).

Due farmaci che presentano effetti simili, quando somministrati contemporaneamente, determinano effetti additivi nel caso in cui il risultato finale corrisponda alla somma degli effetti dei singoli farmaci. Ciò può verificarsi sia se i farmaci agiscono sullo stesso sistema recettoriale che su sistemi distinti. Ad esempio, la contemporanea assunzione di alcuni farmaci che interessano sistemi trasmettitoriali diversi (ansiolitici, tranquillanti, antistaminici H_1) può determinare effetti additivi dannosi sul sistema nervoso centrale, quali intensa sedazione, sonnolenza, riduzione delle capacità psicomotorie. Ciò può diventare pericoloso favorendo, ad esempio, il verificarsi di incidenti in ambito professionale o durante la guida di un veicolo. Analogamente, è altamente rischiosa la contemporanea ingestione di bevande alcoliche, anche in quantità moderata.

L'aspirina (attività antiaggregante) può potenziare l'effetto degli anticoagulanti orali aumentando il rischio di emor-

TABELLA 55.6 Esempi di interazioni farmacodinamiche

Farmaci	Effetti
Ansiolitici + tranquillanti Paracetamolo + codeina	Aumento della sedazione Aumento dell'effetto antalgico
Aspirina + warfarin	Aumento dell'effetto anticoagulante
Naloxone + morfina	Antagonismo
Flumazenil + benzodiazepine	Antagonismo

ragia. La contemporanea assunzione di statine e fibrati comporta un aumentato rischio di tossicità a carico del sistema muscolare (rabbdomiolisi) (Tabella 55.2).

Quando, invece, i due farmaci che presentano effetti simili promuovono una risposta superiore alla somma dei loro singoli effetti, l'interazione viene definita *sinergica*. Esempi di interazioni sinergiche ampiamente sfruttate nella pratica clinica sono l'associazione del trimetoprim con il sulfametossazolo (arrestano la sintesi dell'acido folico batterico interferendo in due tappe sequenziali) e l'associazione antalgica del paracetamolo con la codeina (i due farmaci agiscono su mediatori differenti).

L'*antagonismo* implica, invece, che l'intensità della risposta di un farmaco venga ridotta in seguito all'assunzione di un altro farmaco. L'antagonismo può essere distinto in *recettoriale*, quando il farmaco antagonista si lega al recettore impedendo all'agonista di produrre i propri effetti, e *funzionale* (o *fisiologico*), quando due farmaci, determinano effetti opposti sullo stesso parametro funzionale. Nel primo caso (antagonismo recettoriale), l'antagonismo può essere competitivo. Esempio tipico è costituito dal naloxone che antagonizza gli effetti della morfina, dal flumazenil che antagonizza gli effetti delle benzodiazepine, dai farmaci β -bloccanti che diminuiscono l'efficacia dei broncodilatatori salbutamolo e orciprenalina.

Antagonisti funzionali sono, invece, l'insulina e i glucocorticoidi (diabetogeni).

Antagonismo chimico

Antidotismo

Per antagonismo si intende una reazione chimica tra due sostanze tale da annullare l'effetto del farmaco attivo o, in caso di avvelenamento, della sostanza tossica. In questo

caso, si parla più propriamente di *antidotismo* (Tabella 55.7). Gli antidoti possono modificare le caratteristiche chimiche di un veleno, rendendolo meno tossico o impedendone l'assorbimento. È il caso degli agenti chelanti, quali il dimercapolo, che trovano impiego nel trattamento farmacologico dell'avvelenamento da metalli pesanti (Pb, Zn ecc.) di cui riducono la tossicità legandosi saldamente agli ioni metallo e formando con essi un complesso inattivo.

Interazioni farmaceutiche o incompatibilità

Quando l'antagonismo chimico si verifica in vitro, uno o entrambi i farmaci vengono inattivati. La presenza di due farmaci nello stesso liquido d'infusione può causare reazioni fisico-chimiche di diversa natura (neutralizzazione, salificazione, precipitazione), il cui risultato è la formazione di un prodotto inattivo o di un composto tossico. In questo caso, si parla più propriamente di *incompatibilità* (come succede per l'imipenem che in soluzione è incompatibile con l'eparina, il cloramfenicolo con il gluconato di calcio, la meticcillina con la gentamicina, l'adrenalina con il bicarbonato di sodio) (Tabella 55.7).

È buona norma, quindi, evitare di mescolare tra loro più farmaci, a meno che non sia stata accertata la loro compatibilità.

Interazioni rimedi erboristici-farmaci

Negli anni recenti, l'aumentato uso nella popolazione di rimedi erboristici induce a valutare, con sempre maggiore attenzione, i dati provenienti dalla letteratura riguardanti le interazioni tra prodotti erboristici e farmaci. Alcune erbe contengono sostanze che, potenzialmente, interagiscono con numerosi farmaci, alterandone la risposta terapeutica e rendendola talvolta insufficiente, talvolta dannosa (vedi **CD**: Approfondimento 52.2).

Interazioni farmaci-alimenti

Alimenti e/o integratori dietetici e farmaci possono dare luogo a interazioni rappresentando, dunque, un problema da non trascurare. Possono, infatti, verificarsi una riduzione o un aumento degli effetti del farmaco, con conseguente fallimento terapeutico o comparsa di effetti indesiderati (vedi **CD**: Approfondimento 55.2).

TABELLA 55.7 Esempi di antagonismo chimico

Antidotismo	Dimercapolo nell'avvelenamento da sali di piombo Ammoniaca nell'avvelenamento da formaldeide
Incompatibilità (in soluzione)	Penicillina G + eparina Penicillina G + vitamine del complesso B e C Imipenem + lattato Imipenem + altri antibiotici Gentamicina + ampicillina Gentamicina + eparina Gentamicina + vitamine del complesso B e C

TAKE HOME MESSAGE

- ▶ Per valutare il rapporto rischio-beneficio di un farmaco si debbono tener presenti alcune regole generali:
 - 1) considerare fattori di rischio quali età, condizioni fisiologiche particolari del paziente e/o patologie associate;
 - 2) utilizzare i farmaci con appropriatezza, evitando se possibile la politerapia e monitorando attentamente la risposta clinica del paziente al farmaco;
 - 3) nell'ambito di classi di farmaci aventi proprietà farmacologiche sovrapponibili, utilizzare il farmaco di cui si abbia un'ampia esperienza clinica;
 - 4) tenere ben presente che interazioni sono possibili oltre che tra farmaci anche tra farmaco e alimenti e/o prodotti erboristici.

Bibliografia essenziale

- ▶ Barone GW, Gurley BJ, Ketel BL et al. Drug interaction between St. John's wort and cyclosporine. *Ann Pharmacother* 2000;34:1013-6.
- ▶ Buckley MS, Goff AD, Knapp WE. Fish oil interaction with warfarin. *Ann Pharmacother* 2004;38: 50-5.
- ▶ Del Tacca M, Natale G. Interazioni tra farmaci. In: Clementi F, Fumagalli G (eds). *Farmacologia generale e molecolare*. Torino: Utet, 1999:683-9.
- ▶ Fugh Berman A, Ernst E. Herb-drug interactions: review and assessment of report reliability. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:587-95.
- ▶ Genser D. Food and drug interaction: Consequences for the nutrition/health status. *Ann Nutr Metab* 2008;52(Suppl.1):29-32.
- ▶ Hansten P, Levy RH. Role of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides in drug absorption and distribution: focus on H₁-receptor antagonists. *Clin Drug Invest* 2001;21:587-96.
- ▶ Hunter J, Hirst BH. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Del Rev* 1997;25:129-57.
- ▶ Hutson S. Researchers sound alarm on silent drug interactions. *Nature Medicine* 2011;17:6.
- ▶ Inui KI, Masuda S, Saito H. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney International* 2000;58:944-58.
- ▶ Izzo AI, Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs. *Review Article Drugs* 2009;69:1777-98.
- ▶ Kane GC, Lipsky JJ. Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc* 2000;75:933-42.
- ▶ Karlson B, Leijd B, Hellstrom K. On the influence of vitamin K-rich vegetables and wine on the effectiveness of warfarin treatment. *Acta Med Scand* 1986;220:347-50.
- ▶ Kuo GM, Hawley ST, Weiss LT et al. Factors associated with herbal use among urban multiethnic primary care patients: a cross-sectional survey. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2004;4:18.
- ▶ Lin JH, Lu AJH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 1998;35:361-90.
- ▶ Michalets EL. Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy* 1998;18:84-112.
- ▶ Morselli PL. Interazioni tra farmaci. In: Fuccella LM, Perucca E, Sirtori C (eds). *Farmacologia Clinica*. Torino: UTET, 1999: 141-59.
- ▶ Paeng CH, Sprague M, Jackevicius CA. Interaction between warfarin and cranberry. *J Clin Therapeutics* 2007;8:1730-5.
- ▶ Paine MF, Widmer WW, Hart HL et al. A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1097-105.
- ▶ Piscitelli SC, Burstein AH, Chaith D et al. Indinavir concentrations and St John's wort. *Lancet* 2000;355(9203):547.
- ▶ Reardon LC, Macpherson DS. Hyperkalemia in outpatients using angiotensin-converting enzyme inhibitors. How much should we worry? *Arch Intern Med* 1998;158:26-32.
- ▶ Schmidt LE, Dalhoff K. Food-drug interactions. *Drugs* 2002;62:1481-502.
- ▶ Shaw D, Leon C, Kolev S et al. Traditional remedies and food supplements: a 5-year toxicological study (1991-1995). *Drug Saf* 1997;17:342-56.
- ▶ Silverman JA. P-glycoprotein. In: Levy RH, Thummel KE, Trager WF, Hansten PD, Eichelbaum M (eds). *Metabolic drug interactions*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000: 135-44.
- ▶ Singh BN. Effects of food on clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1999;37:213-55.
- ▶ Spina E, Scordo MG. Drug interactions. In: Shorvon S, Fish DR, Perucca E, Dodson WE, Olivier A (eds). *The treatment of epilepsy*. 2nd ed. London: Blackwell Science, 2005.
- ▶ Turton-Weeks SM, Barone GW, Gurley BJ et al. St John's wort: a hidden risk for transplant patients. *Prog Transplant* 2001;11:116-20.
- ▶ Valli G, Giardina EG. Benefits, adverse effects and drug interactions of herbal therapies with cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1083-95.
- ▶ Vogel JH, Bolling SF, Costello RB et al. Integrating complementary medicine into cardiovascular medicine: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents (Writing Committee to Develop an Expert Consensus Document on Complementary and Integrative Medicine). *J Am Coll Cardiol* 2005;46:184-221.
- ▶ Wachter VJ, Silverman JA, Zhang Y et al. Role of P-glycoprotein and P-450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci* 1998;87:1322-30.
- ▶ Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliver Rev* 1997;27:161-70.
- ▶ Yu DK. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. *J Clin Pharmacol* 1999;39:1203-11.

Indice analitico

A

- Abacavir, 592
- Abatacept, 570
- ABC, 277, 278
- ABCBI, 702
- Acarbosio, 393
- ACAT, inibitori, 381
- ACE, 313
- Aceclidina, 437
- Acetilazione, 85, 91, 669
- AcetilCoenzima A, 432
- Acetilcolina (Ach), 429
 - accumulo intracellulare, 433
 - distribuzione, 429
 - funzione nel SNC, 430
 - funzione nel SNP, 430
 - metabolismo, 431
 - recettori, 434
 - rilascio, 434
 - sintesi, 431
- Acetilcolinesterasi (AChE), 429, 431, 432
- Acetoessimide, 266
- AcetylCholine Binding Protein, 123, 126
- Ach: acetilcolina, 429
- AChE: acetilcolinoesterasi, 429, 431, 432
- Aciclovir, 589
- Acidi grassi, biosintesi, 376
- Acido
 - 3-aminopropilfosfinico (3-APPA), 471
 - acetilsalicilico, 546, 547, 553
 - arachidonico
 - - liberazione, 543
 - - metabolismo enzimatico, 544
 - - metabolismo non enzimatico, 552
 - fusidico, 576, 582
 - nipecotico, 298, 300, 307, 461
 - valproico, 460
 - γ -aminobutirrico (GABA), 459
 - γ -idrossibutirrico (GHB), 471
- ACTH, 499, 501, 502
- Actina, 175, 179, 180
- Adalimumab, 570
- Adantamani, 590
- Adattamento, 75
 - allostatico, 78
 - cellulare, 76
 - molecolare, 76
 - sistemico, 76
- Adefovir, 591
- Adenilato ciclasi, 134, 139, 512
- Adenin nucleotide traslocasi (ANT), 363
- Adenosina, 485, 487, 488, 490, 493
- Adesione/i
 - cellulare, 173, 176
 - focali, 175, 181
- ADME, 608, 612
- ADMET, 608, 609
- Aerosol, 636
- Affinità, 7
 - integrinica, 177
- ω -agatossina IVA, 259
- Agenti
 - alchilanti, 348
 - antiproliferativi, 347
 - citotossici, 347
 - demetilanti, 357
- AGO1, 234, 235
- AGO2, 234, 235
- Agonisti
 - inversi, 60
 - parziali, 57
 - recettoriali, 227
- Agouti Related Peptide (ARP), 501
- AIC: Autorizzazione Immissione in Commercio, 5
- AIDA, 481
- AIDS, 592
- AKAP: A-Kinase Anchoring Protein, 141
- A-Kinase Anchoring Protein (AKAP), 141
- AKT, 113, 155, 180'
- β -alanina, 461
- Alcaloidi, 13
- Alchimia, 10
- Alefacept, 570
- Allilamine, 586
- Allopregnanolone, 462, 467, 469, 472
- Allostasi, 75
- Alotano, 269
- Alpidem, 465
- Amfetamina, 81, 294, 295, 298, 302, 303, 304, 305
- Amfotericina B, 587
- Amidazione C-terminale, 499
- Amineptina, 298
- 4-aminopiridina, 253, 269
- Amiodarone, 253, 257, 271
- Amlodipina, 253, 260, 263
- Ammine vasoattive, 599
- Amminoacidi eccitatori, 294, 296, 297, 307
- Amminoglucosidi, 576
- Amminopeptidasi, 315, 317
- Amprenavir, 318, 324
- Anafilatossine, 599
- Analisi
 - per sottogruppi, 39
 - statistica, 39
- Anandamide, 519
- Anestetici
 - generali, 468
 - locali, 255, 256, 256, 258, 262
 - volatili, 269
- Angiogenesi, 159, 329, 331
- Angiopietina, 148, 149
- Animali transgenici, 17
- ANP: Peptide Natriuretico Atriale, 68
- ANT: Adenin Nucleotide Traslocasi, 363
- Antagonismo, 708, 712, 713
 - chimico, 713
- Antagonista/i
 - competitivi, 56
 - del TNF α , 570
 - recettoriale, 55, 56, 227
- Antianginosi, 253, 260, 263
- Antiarritmici, 253, 256, 257, 258, 260, 263, 264, 270, 271
- Antibatterici, 575
 - meccanismi d'azione, 577
 - meccanismi di resistenza, 584
- Antibiotici, 14
 - meccanismi d'azione, 576, 577
- Anticonvulsivanti, 253, 256, 264
- Anticorpi, 187
 - monoclonali, 158, 187, 569
 - - uso clinico, 358

- policlonali, 569
 - Antidepressivi, 301, 302, 304, 305
 - triciclici, 298, 302, 305
 - Antidotismo, 713
 - Antifolati, 348
 - Antifungini, 585
 - meccanismi d'azione, 585
 - meccanismi di resistenza, 587
 - Antimetaboliti, 349
 - Antimiotonici, 253, 258
 - Antinfettivi, 575
 - Antipertensivi, 253, 263
 - Antiretrovirali, 592
 - Antistaminici, 15
 - Antitubulinici, 351
 - Antitumorali 347
 - bersaglio-specifici, 354
 - convenzionali, 347
 - Antivirali
 - meccanismi d'azione, 588
 - attivi contro virus epatite, 590
 - attivi contro virus influenza, 590
 - attivi contro HIV, 592
 - Antracicline, 353
 - AP-1, 564
 - Apoptosi, 311, 315, 318, 321, 323, 338
 - e ciclo cellulare, 343
 - geni regolatori, 342
 - vie biochimiche, 339
 - Apoptosoma, 342
 - Applicazioni, topico-regionali, 637
 - Aptameri, 236
 - Area sotto la curva di concentrazione plasmatica, 677
 - Arcolina, 437
 - 2-arachidonoilglicerolo, 519
 - ARP: Agouti Related Peptide, 501
 - β -arrestine, 136, 145
 - Arsenobenzoli, 14
 - Artrite reumatoide, 187
 - Ascoclorine, 585
 - Aspartico proteasi, 313
 - Aspirina, 546, 547, 548
 - Assemblaggio recettoriale, 112
 - Associazioni terapeutiche, 707
 - Assorbimento, 617, 618, 620
 - dei farmaci, 629
 - - e cibo, 633
 - Astinenza, 78
 - , meccanismi molecolari, 513
 - Astrocita, 398
 - Aterosclerosi, 373, 377, 379, 381
 - ATP, 485, 486, 487, 488, 491, 493
 - ATPasi, 278, 279, 281, 282, 283, 284, 285, 287
 - Atracurio, 437
 - Atropina, 431, 437
 - Attivatori del plasminogeno (uPA),
 - Attivazione
 - macrofagica, 170
 - di profarmaci, 699
 - Aureobasidina, 585
 - Autofagia, 313, 314, 315, 321
 - Autoimmunità, 560
 - Autoradiografia a corpo intero, 612
 - Autorecettori
 - muscarinici, 434
 - nicotinici, 434
 - Auto-rinnovamento, 192
 - Azatioprina, 561
 - Azoli, 586
- B**
- Baclofen, 461, 464, 469, 470, 471
 - Barbiturici, 461
 - Barriera/e
 - ematoencefalica, 625
 - placentare, 626
 - cellulari, 624
 - Basiliximab, 570
 - Battericidi, 575
 - Batteriostatici, 575
 - BCG, 571
 - BChE: butirrilcolinesterasi, 431, 432
 - Bcl₂, 372
 - BCR-ABL, 156, 157
 - BDNF, 148, 149
 - BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor, 498
 - Belatacept, 570
 - Benzodiazepine, 16, 465
 - Benzodiazepine, 465
 - Benzotiazepine, 260, 261, 263, 264
 - Bestatina, 571
 - Betaina, 297, 298, 299, 300, 301
 - Betanecolo, 437
 - Bevacizumab, 359
 - BGT-1, 461
 - Bicucullina, 461, 462, 463, 469, 471
 - Bid, 316, 322
 - Big pharma, 20
 - Biguanidi, 391, 392
 - Binding, 49
 - Biodisponibilità orale, 631
 - Biodisponibilità, 610
 - Biodisponibilità, 675, 692
 - Bioequivalenza, 608, 615
 - Biofase, 607, 615
 - Bioinformatica, 18
 - chimica, 18
 - Bioingegneria genetica, 18
 - Biological Response Modifiers (BRMs), 559
 - Biotech companies, 19
 - Biotechnology, 17
 - Biotrasformazioni, 663
 - extraepatiche, 670
 - Blastocisti, 192, 193
 - BNP: peptide natriuretico cerebrale, 68
 - Boceprevir, 591
 - Bombesina, 497
 - Bortezomib, 318, 320, 356, 357
 - Botulino-tossine A e B, 434
 - Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), 498

- Brequinar, 563
- Brevetti, 26
- BRMs: Biological response modifiers, 559
- Bumetanide, 290, 292
- α -bungarotossina, 435, 436
- Butirilcolinesterasi (BChE), 431, 432

C

- Ca²⁺ATPasi della membrana plasmatica, 283
- Caderine, 174, 178, 181
- Caenorhabditis elegans*, 339, 340
- Calcineurina, inibitori, 563
- Calcio
 - canali, 96
 - nei mitocondri, 99
 - nel citosol, 95
 - nel nucleo, 101
 - nel reticolo endoplasmatico, 98
 - nella patologia cellulare, 101
 - pompe, 96
 - regolazione della concentrazione intracellulare, 95
 - trasportatori, 96
- Calcio-antagonisti, 261, 263, 264
- Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), 498
- Calcitonina, 498, 502
- Calcium dependent Activator Protein for Secretion (CAPS), 499
- Calmodulina, 564
- Calpaina, 322, 324
- Calpastatina, 312, 315, 323
- cAMP, 67, 136
- cAMP Responsive Element Binding protein (CREB): 207, 213, 214, 215
- Campione, dimensione, 39
- Camptotecine, 352
- Canale/i
 - al Cl⁻, 461, 462, 464, 467
 - f, 141
 - al calcio, 96, 97
 - - voltaggio-dipendenti, 258
 - al potassio, 265
 - al sodio voltaggio-dipendenti, 254
 - anionici, 273
 - cationici, 273
 - di membrana, 623
 - ionici, 245,
 - - caratteristiche, 246
 - - classificazione, 250
 - - e farmaci, 253
 - - funzione, 246
 - - organizzazione strutturale, 249, 250
 - K_{ATP}, 266, 267
 - non selettivi, 273
 - voltaggio-dipendenti, 96, 369
- Canalopatie, 246, 247
- Cannabinoidi, 81

- CAPS: Calcium dependent Activator Protein for Secretion, 499
 Captopril, 318, 319
 Carbacolo, 436, 437
 Carbamazepina, 253, 258
 β -carbolina, 465, 471
 Carbossilazione, 85, 92
 Carbossipeptidasi, 312, 317
 – H, 318
 Carnitina palmitoil trasferasi, 371
 Carrier, 622
 CART: Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript, 500, 503
 Cascata dell'acido arachidonico, 543
 Caspasi, 70, 164, 167, 321, 322, 340, 341
 – ruolo nell'apoptosi, 340
 Catecolamine, 293, 294, 305, 306, 365, 366
 – recettori, 420
 – sintesi, 417
 Catena
 – comune γ_c , 162
 – respiratoria, 364
 Catenine, 174, 181
 β -catenina, 114
 Catepsine, 316
 CCK, 502
 CCK-8, 499, 502
 Cdc42, 114
 Cdk: Cyclin-dependent kinase, 335, 336
 –, regolazione, 336, 337
 Cefalosporine, 576, 579
 Cellula parietale, 282
 Cellule β , 391
 Cellule staminali, 192
 – adulte, 192, 193, 194
 – caratteristiche, 193
 – multipotenti, 192, 193, 194
 – pluripotenti, 192, 193
 – totipotenti, 192
 CEPT, inibitori, 382
 Cerotti transdermici, 642
 Ceruleina, 497
 Cetuximab, 359
 cGMP, 67
 CGRP: Calcitonin Gene Related Peptide, 498, 502
 ChAT: colina acetiltransferasi, 430, 431
 ChE: colinesterasi, 429, 431
 Chemioterapia, 6, 14
 Chemioterapici antitumorali, 560
 Chemochine, 162, 164, 165, 184, 185, 498
 Chetamina, 81
 Chimere, 193
 Chimica
 – combinatoriale, 18
 – farmaceutica, 23
 Chimotripsina, 312
 Chinidina, 257, 271
 Chinina, 13
 Chinoloni, 576, 582
 Chinurenato, 481
 CHT1: Choline Transporter 1, 432
 Cicline, 335, 336
 Ciclo cellulare, 335
 – e apoptosi, 343
 – e cicline, 335
 Ciclofilina A (CypA), 369
 Ciclofilina D (CypD), 369
 Ciclofosfamida, 561
 Cicloserina, 578
 Ciclosporina-A (CsA), 369, 564
 Ciclossigenasi, 545
 Cimetidina, 456, 457, 458
 Cinetica/he
 – di I ordine, 620, 638, 641, 675
 – di assorbimento, 638
 – di equilibrio, 627, 685
 – di ordine zero, 638, 639
 – multicompartimentale, 677
 Circolo entero-epatico, 659
 Circuito mesolimbico-corticale, 515
 Cispentracin, 585
 Cisplatino, 348, 349
 Cisteina proteasi, 312
 Citisina, 435, 436, 437
 Citochine, 183, 184, 185, 572, 573
 – dell'immunità acquisita, 169, 170
 – dell'immunità innata, 167
 – ematopoietiche, 166
 – infiammatorie, 168, 600
 – – e immunosoppressive, 170
 – – primarie, 167, 171
 – – secondarie, 167
 – nell'ematopoiesi, 166
 – recettori per, 161
 Citocromo P450, 664, 665, 667, 710
 Citosol, 95
 c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK), 103, 105
 Classi recettoriali, 117
 Clatrina, 403, 407
 Clavam, 576,
 Clearance, 654, 676, 681, 691
 – d'organo, 654, 655
 – della creatinina, 690, 691, 693
 – epatica, 660, 690, 692
 – renale, 658, 686, 691, 693
 – totale, 654, 655
 Clobenpropit, 456
 Clofilio, 253, 271
 Clopidogrel, 700
 Cloramfenicolo, 576, 581
 Cloroformio, 269
 Clorpropamide, 266
 CNP: peptide natriuretico intestinale, 68
 CNQX, 481
 CNV: Copy Number Variation, 696
 Co-attivatori, 207, 209, 211, 212, 213, 216
 Cocaina, 81, 294, 298, 300, 301, 303, 304, 305
 Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript (CART), 500
 Coefficiente di ripartizione, 618, 620, 625, 630
 Coenzima Q, 365, 370
 Colecistochinina, 430, 434, 497, 500
 Colesterolo, biosintesi, 374
 Colina acetiltransferasi (ChAT), 430, 431
 Colina, 297, 432, 435, 436, 437
 – ricaptazione, 293, 294
 Colinesterasi (ChE), 429, 431
 – inibitori, 433
 Collagene, 148
 Comitato etico, 5
 Compartimento postsinaptico, 404
 Complesso
 – di pre-inizio, 206, 207, 208, 209, 210, 212, 213
 – farmaco-recettore, 50
 Comunicazione intercellulare, 399
 Concentrazione
 – efficace, 681, 687, 692
 – intracellulare di calcio, 95
 – plasmatica, 647, 649
 – – dei farmaci, 675
 – – e dose somministrata, 681
 – – andamento temporale, 679
 – – area sotto la curva, 677
 – terapeutica, 684
 Concezione umorale, 9
 Conduttanza, 125, 127, 130
 Coniugazioni
 – con amminoacidi, 670
 – con glutatione, 670
 ω -conotossina GVIA, 259
 Contract Research Organisation (CRO), 36
 Convertasi del pro-ormone, 499
 Copy Number Variation (CNV): 696
 Co-regolatori, 210, 211, 213
 Co-repressori, 207, 209, 213
 CoREST, 211
 Corpi apoptotici, 338, 339
 – eliminazione, 339
 – formazione, 338
 Corpus hippocaticum, 9
 Corticosteroidi, 567
 Costante
 – di affinità, 49
 – di associazione, 49
 – di dissociazione, 49
 – di eliminazione, 640
 – di tempo di assorbimento, 675
 Co-trasmissione, 500
 Cotrasportatore Na⁺-K⁺-Cl⁻, 290
 – distribuzione, 290
 – farmaci attivi su, 291
 – fisiologia e fisiopatologia, 291
 – proprietà elettrofisiologiche e regolazione, 291
 – struttura, 290
 Cotrasporto, 294
 COX, 544
 Coxib, 546
 Craving, 79

CREB: cAMP Responsive Element
Binding protein, 207, 213,
214, 215, 512, 513, 514

CRF, 497, 501, 503

Crisi d'astinenza, 78

CRO: Contract Research Organisation,
36

Cromakalim, 253, 266, 268

Cromatina, 92

Cross-talk, 112

CsA: ciclosporina A, 369, 563, 564

CSF-1, 148, 148

Cue reactivity, 79

Curari, 15, 435, 437

Curva
– concentrazione-risposta, 53
– di binding, 59
– dose-risposta, 53, 54, 55

Cyclic AMP-Responsive Element
DNA-Binding protein (CREB),
512, 513, 514

Cyclin-dependent kinase (Cdk), 335

CYP, 665, 673, 674

CypA: ciclofilina A, 369

CypD: ciclofilina D: 369

D

Daclizumab, 570

Daptomicina, 583

Darunavir, 592

DAT, 294, 295, 298, 299, 300, 301,
302, 303, 304, 305, 307

Ddr, 148, 149

Debio 025, 370

Decoy receptors, 71

Deltorfine, 506, 509

Demenza
– alcolica, 431
– di Alzheimer, 431, 433, 436, 437
– pugilistica, 431

Demetilasi, 92

Dermorfine, 506, 509

Desaturasi degli acidi grassi, 377

Desensitizzazione, 7, 72, 512

Desossipergualina, 563

Deubiquitinasi, 312, 313

DFP: diisopropilfluorofosfato, 433

DGAT, 378

Diacilglicerolo, 142
– aciltrasferasi, inibitori, 378

3,4-diaminopiridina, 253, 270

Differenziamento, 194, 201

Diffusione facilitata, 622

Diidropiridina, 259, 260, 261, 263,
264

Diisopropilfluorofosfato (DFP), 433

Diltiazem, 253, 257, 260, 263, 264,
273, 274

Dimaprit, 456, 458

Dinorfine, 505

Dipendenza, 8, 78, 80

Disopiramide, 253, 257, 271

Dissolubilità del farmaco, 630

Distribuzione dei farmaci, 645

Ditiocarb, 571

Diuretici dell'ansa, 290, 291

DNA topoisomerasi, 351, 352

Dofetilide, 253, 257, 270, 271

Dominio DD, 164

Dominio TIR, 163, 164

Donepezil, 433

Dopamina, 513, 515

Dosi d'accumulo, 684

Downregulation, 7

Droga, 5
– classi di, 79

Dronedarone, 257, 271

Drug delivery, 20, 642

Drug discovery, 26

Dualismo recettoriale nucleo/
citoplasma 111

E

EAAT: Excitatory Amino Acid
Transporters, 474

EC₅₀: Effective Concentration 50, 54

ECE, 313

Echinocandine, 585

ED₅₀: Effective Dose 50, 54

Edrofonio, 433

Efalizuma 570

Efavirenz, 592

Effective Concentration 50 (EC₅₀), 54

Effective Dose 50 (ED₅₀), 54

Effetti/o
– collaterali, 8
– di primo passaggio, 633, 712

Effettori dell'infiammazione, 599

Efficacia, 7

Eflornitina, 585

EFPIA, Associazione Europea
Industrie Farmaceutiche

Efrina A,B, 148, 149

EGF, 147

EGFR, 148, 149, 159

Eicosanoidi, 543, 599

Eledoisina, 497

Eliminazione dei farmaci, 645

Elisir di lunga vita, 10

EMA: European Medicines Agency,
26, 37

Ematopoiesi, 166

Emicolinio-3 (HC3), 432

Emivita, 638, 653

Emopoietine, 161, 162

Emtricitabine, 592

Enalapril, 318

Encainide, 253, 257

Encefaline, 505, 506, 509

End points,
– primari, 38
– secondari, 39
– surrogati, 39

Endocannabinoidi
– agonisti diretti, 523
– agonisti indiretti, 525
– antagonisti, 525
– ligandi endogeni, 518
– recettori, 517

Endocitosi, 402, 493, 620
– mediata da recettore, 621

Endomorfine, 506, 509

Endopeptidasi, 315, 321

Endoproteasi extracellulari, 328

Endorfine, 505

β-endorfina, 499, 502, 505

Enfuvirtide, 592

Enkefaline, 497, 500

Entecavir, 591

Enzimi
– di fase I, 697
– di fase II, 700
– farmaco-metabolizzanti, 663

EphA, 148, 149

Epibatidina, 435, 436

Epilessia, 301, 307

ER Ca²⁺ATPasi, 284
– distribuzione, 284,
– modulazione farmacologica, 285
– proprietà fisiologiche, 285
– struttura, 284

ErB 1,4, 148, 149

Erbe medicinali, 5

β-eritroidina, 435

Eritropoietina, 162

ERK: Extracellular-signal Regulated
Kinases, 103, 104, 512, 514

ERK½, 366

ERK5, 107

Erlotinib, 157, 159

Escrezione
– epatica dei farmaci, 659
– renale dei farmaci, 655

Esocitosi, 403, 408, 434

Esopeptidasi, 315, 318

Esplorazione farmacoterapica, 16

Espressione genica, regolazione, 209,
210, 213

Esteri nitrici, 540

Etanercept, 570

Etanolo, 81, 468

Etosuccimide, 253, 261, 264

European Medicines Agency (EMA),
26, 37

Excitatory Amino Acid Transporters
(EAAT), 474

Extracellular-signal Regulated Kinases
(ERK), 103, 104

F

F₀F₁ATPasi, 371

Faclofen, 471

FAK, 178, 179

Famciclovir, 589

FANS: Farmaci Antinfiammatori
Non Steroidei, 546

Farmaci/o 4
– agonista, 7, 55
– – inverso, 7

- parziale, 7
 - affinità, 7
 - per il recettore, 57
 - approvazione, 36, 42, 43
 - attività intrinseca, 57
 - antagonista, 7
 - allosterico, 7
 - antifungini, 585
 - antinfettivi, 575
 - antinfiammatori non steroidei (FANS), 546
 - antitumorali, 347
 - bersaglio-specifici, 354
 - convenzionali, 347
 - antivirali, 588
 - assorbimento, 617, 629
 - biologici, 28
 - biosimilari, 26
 - biotecnologici, 29
 - candidato per lo sviluppo, 33
 - coefficiente di ripartizione, 618
 - commercializzazione, 37, 41, 43
 - competizione, 7
 - concentrazione, 617, 623
 - plasmatica, 675
 - diffusione
 - a organi e tessuti, 623
 - attraverso canale, 621
 - passiva, 618, 620
 - di sintesi, 13
 - distribuzione, 618, 645
 - e apoptosi, 344
 - effetti collaterali, 6, 8
 - efficacia, 7, 53, 54, 57
 - eliminazione, 618, 645
 - e malattie rare, 26
 - endo-esocitosi, 618
 - e recettore, 7
 - e recettori-canale, 131
 - equivalenti, 4
 - escrezione, 618
 - fasi dello sviluppo, 31
 - generici, 4, 26
 - immunosoppressori, 560
 - immunostimolanti, 571
 - interazioni, 707
 - con sistemi viventi, 7
 - metabolismo, 618, 663
 - misura degli effetti, 7
 - nome
 - chimico, 4
 - commerciale, 4
 - generico, 4
 - orfani, 26, 33
 - passaggio dalle membrane cellulari, 618
 - potenza, 7, 53
 - prescrizione, 5
 - ricerca e sviluppo, 35
 - selettività, 7
 - somministrazioni ripetute, 679, 681, 682, 683
 - specializzati, 42
 - sperimentazione clinica, 35, 38, 42
 - sviluppo, 36, 37, 42, 43
 - trasporto attraverso membrane cellulari, 620
 - uso compassionevole, 5
 - uso off label, 5
 - velocità di assorbimento, 630
 - vie di somministrazione, 617, 618, 629
 - Farmacocinetica, 30, 607, 608, 652
 - basi cellulari, 617
 - e metabolismo, 608, 612, 615
 - Farmacodinamica, 608
 - Farmacoeconomia, 6, 16
 - Farmacoepidemiologia, 16
 - Farmacoepigénomica, 205
 - Farmacogenetica, 6, 695
 - Farmacogenomica, 6, 695
 - Farmacologia, 6
 - cellulare e molecolare, 6
 - clinica, 6
 - di genere, 21
 - generale, 6
 - introduzione alla, 1
 - principi di, 3
 - storia della, 9
 - vegetale, 9
 - Farmaco-resistenza agli agenti antitumorali, 360
 - Farmacovigilanza, 6, 16
 - Farnesil-PP sintetasi, inibitori, 375
 - FAS: sintetasi degli acidi grassi, 377
 - Fattore/i
 - di crescita, 147, 148, 149
 - ematopoietici, 573
 - endoteliale vascolare (VEGFR), 87
 - di trascrizione, 206, 208, 209, 213, 214
 - inducibili, 213
 - legame al DNA
 - epigenetici, 357
 - generali di trascrizione, 205
 - FDA: Food and Drug Administration, 25, 36
 - Felbamato, 258
 - Felodipina, 253, 260
 - Fenciclidina, 81
 - Fenfluramina, 298, 302
 - Fenilalchilamine, 260, 261, 263, 264
 - 2-fenilistamina, 456
 - Fenitoina, 253, 255, 257, 258
 - Fentanil, 513
 - FGF, 148, 149
 - Fibrati, 380
 - Fibronectina, 328
 - Fibrosi cistica, 491, 494
 - Finestra terapeutica, 617
 - Fisalemina, 497
 - Fisostigmina, 433
 - Fit-3L, 149
 - FK506, 564
 - Flecainide, 253, 257
 - Flogosi, 174, 178
 - Flucitosina, 587
 - Flumazenil, 462, 463, 471
 - Flupirtina, 253, 268, 272
 - Flusso specifico, 623
 - Fomivirsen, 589
 - Food and Drug Administration (FDA), 25, 36
 - Forma farmaceutica, 32
 - Formulazioni, 642
 - farmaceutiche, 4
 - ritardo, 641
 - Foscarnet, 589
 - Fosfatidilcolina, 429, 432
 - Fosfatidilinositolo-3-chinasi, 139
 - Fosfenitoina, 258
 - Fosfodiesterasi, 134, 138, 140, 141
 - Fosfolipasi, 544
 - C, 142
 - C- β , 142
 - C- γ , 142
 - Fosfomicina, 578
 - Fosforamidon, 313, 318
 - Fosforilazione, 85, 86, 123, 128
 - Fosforoamidati, 239
 - Fosforotioati, 239
 - LNA: Locked Nucleic Acids, 239
 - Furina, 318, 324
 - Fusidani, 576,
- G**
- GABA: acido γ -aminobutirrico, 293, 297, 298, 299, 300, 301, 303, 306, 307, 459
 - distribuzione, 459
 - liberazione, 461
 - metabolismo, 459
 - ricaptazione, 461
 - sintesi, 460
 - GABA- α -chetoglutaricotransaminasi, 460
 - Gabapentinoidi, 264
 - GABA-T, 460
 - Gabazina, 461, 462
 - GAD: Glutammato Decarbossilasi, 459, 460, 471
 - Galantamina, 433
 - Galeno, 10
 - Ganciclovir, 589
 - Ganglioplegici, 435, 437
 - GAP, 153
 - Gas nervini, 433
 - Gas6, 148, 149
 - GAT, 298, 300, 301, 306, 307
 - GCP: Good Clinical Practices, 31
 - GDNF, 148, 149
 - Gefirina, 72
 - Gefitinib, 157, 159
 - Gene therapy, 644
 - Genomica, 20
 - Genotipo individuale
 - GHB: acido γ -idrossibutirrico, 471
 - GI, 388
 - Giunzione comunicante, 398
 - Glia, 293, 297, 298, 300, 398

Glibenclamide, 266
 Gliburide, 266
 Glicazide, 266
 Glicemia, controllo, 386
 Gliciclazide, 266
 Glicina, 293, 297, 306, 307
 Glicoproteina P
 Glicosidi cardioattivi, 278, 281
 Glicosilazione, 85, 91
 Glicosilfosfatidilinositoli, aggiunta di, 85, 93
 Glicuroconiugazioni, 668
 Glimepiride, 266
 Glinidi, 266, 388, 391
 Glipizide, 266
 Gliquidone, 266
 Glisolamide, 266
 GLP: Good Laboratory Practices, 31
 GLP-1, 389
 Glucocorticoid-Responsive Elements (GRE), 64
 Glucosidi, 13
 Glucosio, trasporto transmembrana, 386
 GLUT, 386, 387, 389
 Glutammato, 473
 –, accumulo vescicolare, 474
 – decarbossilasi (GAD), 459, 460, 471
 – e depressione, 482
 – metabolismo, 474– sintesi, 473
 Glutammina sintetasi, 460
 GMP: Good Manufacturing Practices, 31
 Good Clinical Practices (GCP), 31
 Good Laboratory Practices (GLP), 31
 Good Manufacturing Practices (GMP), 31
 Gp130, 162, 163, 168, 169
 GPCR, 507, 513
 GPI-anchor, 93
 Graft Versus Host Disease (GVHD), 562
 Granuli di secrezione, 401
 Granzima B, 313, 321
 Grb2, 153
 GRE: Glucocorticoid-Responsive Elements, 64
 GRH (Gastrin Releasing Hormone), GRH
 Griseofulvina, 587
 Gruppo di controllo, 38
 Gruppo sperimentale, 39
 GSK3, 113
 GTPasi, 180, 181
 – monomeriche, 137
 GVHD: Graft Versus Host Disease, 562

H

H⁺/K⁺ATPasi, 281
 – distribuzione, 282
 – farmaci attivi su, 283
 – proprietà biofisiche, 282

– regolazione, 282
 Hedgehog, 112, 115
 Herbicidine, 585
 HGF, 148, 149
 High Temperature Requirement A (HTRA): 320
 High Throughput Screening (HTS), 24
 Hit, 27
 HIV, 313, 318, 324
 HMG-CoA reductasi, inibitori, 374
 5-HT: 5-idrossitriptamina, vedi Serotonina
 HTRA: High Temperature Requirement A, 320
 HTS: High Throughput Screening, 24

I

Iatrochimici, 12
 Iatromeccanici, 12
 ICAM, 174, 175, 176, 180
 ICAM-1, 560, 568
 ICE, 312, 313, 318
 Idrolisi, 667
 Idrossilazione, 85, 92
 5-idrossitriptamina (5-HT), vedi Serotonina
 IGF-1, 148, 149
 IL-1, 184, 185
 IL-6, 184, 185, 186
 Imatinib, 157, 182, 354, 355, 357
 Imetit, 456
 Immezip, 456
 Immunofiline, 169
 Immunosoppressori, 560
 Immunostimolanti, 571
 Impromidina, 456
 Inattivazione del segnale serotoninergico, 443
 Incompatibilità, 713
 Incretine, 388, 392, 393
 Indice di estrazione, 655
 Indice terapeutico, 8, 617
 Indinavir, 318, 324
 Industria farmaceutica, 13, 20, 26
 Industrie biotecnologiche, 26
 Induttori dell'infiammazione, 596
 Induzione
 – del metabolismo dei farmaci, 671
 – enzimatica, 709, 711
 – farmaco-metabolica, 671
 Infiammazione, 178, 180, 595
 – acuta, 596
 – cronica, 393, 596
 – effettori, 599
 – induttori, 596
 – mediatori, 599
 – strategie farmacologiche, 595
 Infliximab, 570
 Ingegneria genetica, 17
 Inibitori
 – del proteasoma, 356
 – dell'enzima DPP-IV
 – delle DNA topoisomerasi, 351, 352
 – delle proteasi, 327
 – di HSP90, 356
 – di istone deacetilasi, 357
 – di PI3K-AKT-mTOR, 355
 – di pompa protonica, 281, 283
 – di Raf-MEK-ERK, 355
 Inibizione
 – del metabolismo dei farmaci, 672
 – enzimatica, 709
 – farmaco-metabolica, 671
 Inosina, 571
 Inositolo 1,4,5-trisfosfato, 138, 142
 Inside-out signalling, 175
 Insulina, 148
 – recettore, 390
 – secrezione, 387, 388
 – signalling, 392
 Insulinoreistenza, 393
 Integrine, 174, 175, 178, 181
 – attivazione, 177
 – classificazione, 175
 – struttura, 174
 – trasduzione del segnale, 178, 180
 Interazioni
 – farmaci-alimenti, 713
 – farmaco-recettore e risposta, 54
 – farmacocinetiche, 708
 – – in fase di assorbimento, 708
 – – in fase di biotrasformazione, 709
 – – in fase di distribuzione, 709
 – – in fase di escrezione, 712
 – farmacodinamiche, 712
 – farmaco-recettore, 47
 – – caratteristiche, 49
 – – irreversibili, 49
 – – reversibili, 49
 – rimedi erboristici-farmaci, 713
 – tra farmaci, 707
 – tra recettori, 131
 Interferoni, 162, 166, 171, 573, 590
 Interleuchina-2, 572
 Internalizzazione, 512
 Iodofenpropit, 455, 456
 Iodoprossifan, 455
 Idoxuridina, 589
 IP₃, 565
 Ipercolesterolemia, 374, 384
 – terapia, 374
 Ipertrigliceridemia, 378
 Irinotecan, 701, 705
 IRS-1, 153
 Ischemia
 – cardiaca, 287, 288
 – cerebrale, 284, 285, 288
 Isoflurano, 269
 Isoniazide, 460, 471
 Isoprostani, 543, 544, 545, 552
 Isoterme di legame, 51, 53
 Isradipina, 253, 260, 263
 Istamina
 – distribuzione, 450,
 – e muscolatura bronchiale, 453
 – e risposta immunitaria, 453

- e secrezione gastrica, 453
- e sistema cardiovascolare, 451
- e sistema nervoso, 450, 451
- funzioni, 450, 451, 452, 453
- metabolismo, 454
- sintesi, 454
- struttura chimica, 449
- Istidino decarbossilasi, 450, 454, 456
- Istone/i, 210, 211
- acetiltrasferasi (HAT), 92, 207, 210, 211
- deacetilasi, 92
- ITAM, 178
- Ivabradina, 253, 273, 275

J

- JAK, 572
- JNJ 7777120, 456
- JNK: c-Jun NH₂-terminal Kinase, 103, 105, 565

K

- Kainato, 478
- Kassinina, 497
- KCO: Potassium Channel Openers, 266, 268, 269, 272, 273
- Ketamina, 482, 483
- Kindlina, 176
- Kiss and run, 403

L

- Lacidipina, 263
- Lamivudina, 591
- Lamotrigina, 253, 258
- Lapatinib, 159
- Large Dense-Core Vesicles (LDCV), 499
- Lattacistina, 318, 320
- β -lattamici, 576, 579
- Laudano, 12
- L-DABA, 298, 300
- LDCV: Large Dense-Core Vesicles, 499
- Lead compound, 26
- Lecitina, 432
- Legami
 - alle proteine, 610, 618, 626
 - disolfuro, 85, 92
 - farmaci-proteine plasmatiche, 648, 660, 686
- Legge di azione delle masse, 48
- Legge di Fick, 620, 623
- Legislazione farmaceutica, 31
- Lercanidipina, 263
- Leucociti, 173, 174, 175, 176, 180
- Leucotrieni, 543, 550
- Levamisolo, 571
- Levcromakalim, 266
- LFA-1, 177
- Lidocaina, 253, 255, 256, 257, 258

- Ligandi, 7
 - ortosterici, 56
 - per recettori intracellulari, 222
 - - classi, 222
- Lincosamidi, 576, 582
- Lipide A, 571
- Lipidi, 373
 - aggiunta di, 85, 93
 - proteine di trasferimento, 380
- Liposomi, 643
- Lipossigenasi, 550
- Lipossine, 551
- β -lipotropina, 499
- Liquido cefalo-rachidiano, 625, 626
- Lisosomi, 314, 315, 316, 321
- Litio, 141, 142
- Locked Nucleic Acids (LNA), 239
- Lopinavir, 318, 324, 592
- L-triptofano, 443

M

- Macroautofagia, 315
- Macrolidi, 581
- Malattie degenerative del sistema dopaminergico, 304
- Malattie rare, 26
- Mandragora, 9
- Manidipina, 263
- MAO: monoamminoossidasi, 356
- MAO-A, 443
- MAP chinasi, 70, 89
 - inibizione farmacologica, 108
 - meccanismi di attivazione, 103
 - specificità d'azione, 107
- MAP: Mitogen Activated Protein, 565
- MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase, 103, 139, 154, 155, 157, 367, 512, 513
- Maprotilina, 298
- Maraviroc, 592
- Mastociti, 450, 453, 455
- Matrice extracellulare, degradazione proteolitica, 327
- McN-A-343, 437
- MDMA, 298, 302, 303
- MDP, 571
- MDR: Multi-Drug Resistance, 622
- MDR1, 702
- mEAAC, 297
- Mecamilamina, 435, 437
- Mediator, 208
- Mediatori dell'infiammazione, 599
- Medicina/e
 - antica, 9
 - monastica, 10
 - personalizzata, 43
 - primitiva, 9
 - rigenerativa, 191
 - - applicazioni, 195, 196, 197
 - - ex vivo, 192
 - alternative, 3
- Meglitinide, 266
- Melanocyte Stimulating Hormone, MSH, 502
- Memantina, 483
- Memoria, 75
- Mepiramina, 455, 456
- Merger, 20
- Met, 148, 149
- Metabolismo
 - dei farmaci, 663
 - - induzione, 671
 - - dei farmaci, inibizione, 672
 - glucidico, controllo farmacologico, 386
 - lipidico, 379
- Metaboliti
 - reattivi, 613
 - stabili, 613
- Metacolina, 437
- Metallo proteasi, 313
 - della matrice (MMP), 327, 330
 - - modulazione farmacologica, 331
- Metamfetamina, 445
- Metanalisi, 8
- Metilazione, 85, 92, 669
- Metiltrasferasi, 92
- Metilxantine, 485, 494
- Metotrexato, 561
- Mevalonato, 375
- Mexiletina, 253, 257, 258
- Mibefradil, 257, 261, 264, 271
- Micofenolato mofetile, 561
- Microparticelle, 642
- MicroRNA (miRNA), 234
- Minoxidil, 266, 268
- Miorilassanti, 253, 256
- Miristilazione, 85, 93
- miRNA: microRNA, 234
- Mitochondrial translocator protein, 370
- Mitocondri, 363
 - farmaci, 371
 - organizzazione, 363
 - struttura, 363
- Mitogen Activated Protein (MAP), 565
- Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK), 103, 139, 154, 155, 157, 367, 512, 513
- Mitosi, 335, 336
- Mivacurio
- Mizoribina, 563
- MK801, 483
- MMP: metalloproteasi della matrice, 327, 330
- Modellistica molecolare, 27
- Modificazioni post-traduzionali, 85
 - , classificazione, 85
- Modulatori
 - allosterici, 56
 - sintetici dell'attivazione della trascrizione, 216
- Monoamminoossidasi (MAO), 365
- Monobattami, 576, 579
- Monossido di azoto, 365
- Morbo di Crohn, 187

Morfina, 13, 513, 514
 Morfoline, 586
 Morte cellulare, 338, 601, 602
 – programmata, 338
 MSH: Melanocyte Stimulating
 Hormone, 502
 MSP, 148, 149
 mTORC1, 114
 mTORC2, 114
 MTP, inibitori, 383
 Multi-Drug Resistance (MDR), 622
 Mupirocina, 582
 Muscarina, 434, 437
 Muscimolo, 461, 471
 MuSK, 148
 Mutagenesi, 28

N

Na⁺/K⁺ATPasi, 279
 – farmaci attivi su, 281
 – proprietà biofisiche, 280
 – struttura, 279
 – traduzione del segnale, 280
 N-acetilprocainamide, 253, 271
 Nanofarmacologia, 21
 Nanotecnologie, 24, 32
 Nateglinide, 266
 NCX, vedi Scambiatore Na⁺/Ca²⁺
 Necrosi, 344
 Nelfinavir, 318, 324
 Neostigmina, 433
 Neprilisina, 313, 318
 Nerve Growth Factor (NGF), 112,
 148, 149, 432
 NET, 298, 304, 305
 Neureguline, 148, 149
 Neuroesocitosi, 408
 Neurogranina, 113
 Neurokinina A, 499
 Neurone/i
 – istaminergico, 456
 – peptidergico, 499
 – serotoninergici, 439, 445
 – bersagli farmacologici, 445
 Neuropeptide Y, 500
 Neuropeptidi, 400, 497, 501
 – caratteristiche, 497
 – potenzialità terapeutiche, 501
 – significato funzionale, 501
 – sintesi, 498
 Neuroplasticità, 75
 Neurosteroidi, 462, 464, 467
 Neurotrasmettitori, 293, 294, 296,
 297, 305, 400, 404, 412
 Neurotrasmissione
 – extrasinaptica, 501
 – mediata da aminoacidi eccitatori,
 473
 – volume-dipendente, 500
 Neurotrasportatori, 293
 – per aminoacidi eccitatori, 294
 – –, organizzazione molecolare, 296
 – per neurotrasmettitori, 294, 296
 – regolazione, 294
 – ruolo nella funzionalità sinaptica,
 293
 Neurotrofine, 113, 498
 NF-κB, 164, 320, 564
 NF-AT: Nuclear Factor of Activated T
 lymphocytes, 564
 NGF: Nerve Growth Factor, 112, 148,
 149, 432
 N-glicosilazione, 91
 NHE, vedi Scambiatore Na⁺/H⁺
 Nicardipina, 260, 263
 Nicorandil, 266, 268
 Nicotina, 81, 434, 435, 436, 437
 Nifedipina, 253, 259, 260, 263
 Nikkomicina, 586
 Nim 811, 370
 Nimodipina, 259, 260, 263
 Nitrendipina, 260, 263
 Nitrofurani
 Nitroimidazoli
 Nitrosilazione, 92
 Nitrovasodilatatori tradizionali, 540
 NKCC, vedi Cotrasportatore Na⁺-K⁺-
 Cl⁻
 N-metil-4-(1-naftilvinil)piridinio, 432
 NNH: Number Needed to Harm, 40
 NO, 528
 – e apparato cardiovascolare, 534
 – e apparato muscolare, 538
 – e malattie metaboliche, 536
 – e microRNA, 533
 – e sistema immunitario, 539
 – e sistema nervoso, 569
 – e sistema respiratorio, 536
 – sintasi, 528
 Nocicettina, 506
 NOP, 506
 Norepinefrina, 366
 NOS, 528, 529, 530
 –, inibitori, 541
 NPY, 500, 501, 502
 NSK, 148
 NT-3,5, 148
 Nuclear Factor of Activated T
 lymphocytes (NF-AT), 564
 Number Needed to Harm (NNH), 40
 Number Needed to Treat (NNT), 40

O

OAT1B1, 702
 Obesità, 373, 376, 377
 Occupancy assumption, 54
 O-glicosilazione, 91
 OKT3, 569, 560
 2'-O-alcilribonucleotidi, 239
 Oligonucleotidi antisenso, 236
 Olsetamivir, 590
 Omalizumab, 570
 Omeopatia, 5
 Omeostasi, 75
 – del calcio intracellulare, 95
 – mitocondriale del Ca²⁺, 368

Omeprazolo, 283
 Operon colinergico, 434
 Oppiacei, 81
 – agonisti, 510, 511
 – astinenza, 513
 – dipendenza fisica, 511
 – dipendenza psichica, 514
 – e analgesia centrale, 509
 – e analgesia periferica, 510
 – e assunzione di cibo, 510
 – e depressione respiratoria, 510
 – e dolore cronico, 515
 – effetti cardiovascolari, 510
 – e motilità viscerale, 510
 – e sistema immunitario, 511
 – tolleranza, 511
 Oppio, 13
 Oppioidi
 – effetti, 508
 – e sistema limbico, 514
 – e trascrizione genica, 513
 Orphan diseases, 26
 Orti botanici, 10
 Ossazolidinoni, 576, 581
 β-ossidazione, 371
 Ossidazioni, 664
 Ossido nitrico, 92
 – azione cellulare, 538
 – biochimica, 531
 – biosintesi, 528
 – chimica, 527
 – effetti sistemici e d'organo, 534
 – farmacologia, 527, 540
 Ossitocina, 500, 501, 502
 Ossotremorina, 437
 Outside-in signalling, 175
 Oxcarbazepina, 253, 258

P

p38, 106
 p53, 320, 337
 p66^{Shc}, 365, 366, 367
 P75^{NTR}, 112
 PACAP, 113
 PAI: Plasminogen Activator Inhibitors,
 327, 329, 330, 331
 PAK, 155
 Palmitilazione, 85, 93
 Pancuronio, 435, 437
 Paracelso, 11
 Parathion, 433
 Patch clamp, 130
 Pattern recognition receptors, 596,
 598
 Pazopanib, 159
 PBR: Peripheral Benzodiazepine
 Receptor, 370
 PC1, 318
 PC2, 318
 PDGF, 148, 149
 Pemciclovir, 589
 Penicillina, 15, 575, 579
 Pepstatina, 312, 324

- Peptidi
 – oppioidi, 499
 – – endogeni, 505, 507
 – vasoattivi, 599
 Peptidil Nucleic Acid (PNA), 239
 Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR), 370
 Permeabilità, 609, 624, 625
 – mitocondriale, 369
 Perossidazione lipidica, 543, 544, 552
 Perossido di idrogeno, 364
 Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR), 372, 379
 Personalizzazione della terapia, 695
 PI3-chinasi, 112, 178, 180
 PI-3K, 153, 155, 157
 Piastrine, 173, 174, 175, 176, 178, 181
 Picco di concentrazione plasmatica, 639, 678
 Pictotossina, 461, 462, 472
 Pietra filosofale, 10
 Pilocarpina, 437
 Pinacidil, 266, 268
 Pirenzepina, 438
 Pirimidine, 485, 487
 – analoghi, 349
 Piruvico deidrogenasi, 371
 PK2: Prokineticin-2, 503
 PKA: proteinchinasi A, 87, 88, 140, 143
 PKC: proteinchinasi C, 87, 88, 140, 143
 Placebo, 5
 Plasminogen Activator Inhibitors (PAI), 327, 329, 330, 331
 Plasminogeno, 327, 328
 – attivatori, 328
 – funzioni, 329
 – sistema, 328
 – – modulazione farmacologica, 330
 Plasmodium falciparum, 318, 324
 Plasticità, 192
 PLC- γ , 153
 Pluripotenza, 193, 194
 PNA: Peptidil Nucleic Acid, 239
 PTGS: Post-Transcriptional Gene Silencing, 234
 Polieni, 587
 Polifarmacoterapia, 707
 Polimerasi II, 205, 205, 207, 208, 214
 Polimeri bioadesivi, 642
 Polimixine, 583
 Polimorfismi
 – a singolo nucleotide, 696
 – genetici, 696, 697,
 – – di CYP2D6, 697
 – – e metabolismo dei farmaci, 696
 – – e superfamiglia citocromo P450, 698
 – – e trasportatori dei farmaci, 702
 – – nei geni codificanti per gli enzimi di fase I, 697
 – – nei geni codificanti per gli enzimi di fase II, 700
 – – nei geni codificanti per i bersagli terapeutici, 703
 – – nei recettori β -adrenergici, 704
 PolyAU, 571
 POMC, 501
 Pompa protonica, 281, 282, 283
 Pompe al calcio, 97
 Poro di transizione mitocondriale (PTP), 369, 370
 Postsinapsi, 397
 Post-Transcriptional Gene Silencing (PTGS), 234
 Potassium Channel Openers (KCO), 266, 268
 Potenza, 7
 PPAR: Peroxisome Proliferator Activated Receptor, 372, 379, 380
 – agonisti, 380
 – modulazione farmacologica, 379
 Pralidossima metilioduro, 433
 Pralnacasan, 318, 322
 pRb, 339, 342
 Pre-condizionamento ischemico, 492
 Pregnenolone solfato, 462, 467
 Prenilazione, 85, 93
 Preparazione magistrale, 4
 Preparazione officinale, 4
 Pre-pro-peptide, 498, 499
 Presinapsi, 397
 Principio attivo, 13
 Procainamide, 253, 257, 271
 Pro-CCK, 499
 Pro-colecistochinina, 499
 Prodinorfina, 505, 506
 Proencefalina, 505, 506
 Prokineticin-2 (PK2), 503
 Promotore, 206, 208
 – co-attivatori, 207, 209, 211, 212, 213, 216
 – co-regolatori, 210, 211, 213
 – co-repressori, 207, 209, 213
 Proopiomelanocortina, 505
 Propafenone, 253, 257
 Pro-peptide, 499
 Prostaciclina, 545, 549, 552
 Prostaglandine, 544, 545, 552
 Prostanoidi, 543, 553
 Proteasi
 – caratteristiche, 311
 – citoplasmatiche, 319
 – classificazione, 311
 – compartimentalizzate, 317
 – di maturazione, 317
 – di segnale, 317
 – extracellulari, applicazioni farmacologiche, 331
 – inibitori, 312
 – intracellulari esogene, 324
 – lisosomiali, 314
 – localizzazione intracellulare, 312
 Proteasoma, 319, 320, 356
 Proteina p66^{Shc}, 366
 Proteinchinasi, 86
 – A (PKA), 87, 88, 140, 143
 – attivazione, 87
 – C (PKC), 87, 141, 142
 – Ca²⁺/calmodulina-dipendente di tipo II (CaMKII), 87, 88
 – classificazione, 86
 Proteine
 – AKAP, 141
 – argonauta, 234
 – della matrice, 328, 330
 – di trasferimento dei lipidi, 381
 – G, 66, 67, 72, 73, 137
 – – ciclo di attivazione, 137
 – – effettori, 67
 – – mutazioni, 138
 – – subunità $\beta\gamma$, 139
 – – subunità α , 138
 – G₁₂, 139
 – G_i, 139
 – G_q, 137
 – G_s, 136
 – Homer, 143
 Proteinfosfasi, 88
 – a funzione mista, 89
 – classificazione, 88
 Proteolisi
 – extracellulare, 327
 – intracellulare, 311
 – – modulazione farmacologica, 314
 – – regolazione, 313
 Proteomica, 20
 Protocollo di studio, 36, 38
 – fasi, 36
 Protocollo terapeutico, impostazione 692
 Protooncogeni, 147
 PSGL-1, 176, 177, 178, 181
 Psicofarmaci, 15
 PTB, 152, 153
 PTEN, 367
 PTP: poro di transizione mitocondriale, 369, 370
 Purine
 – analoghi, 349
 – effetti sul sistema cardiovascolare, 492
 – effetti sul sistema nervoso, 493
 – effetti sul sistema respiratorio, 494
 – fonti, 486
 – metabolismo, 486
 – nella terapia antitumorale, 495
 – recettori, 488
 – rilascio, 486
 – ruoli biologici, 492

Q

- Quanto, 400
 Quota legata, 648
 Quota libera, 648

R

- Rac, 114
- Radicale superossido, 364
- Radicali liberi, 527, 535
- Rafe, nuclei del,
- Raltegravir, 592
- RAMP: Receptor Activity Modifying Proteins, 144
- Randomizzazione, 37
- Ranitidina, 456, 457, 458
- Rapamicina, 566
- Rapporto rischio/beneficio, 40, 41
- Ras, 154
- RCCs: Receptor Ca²⁺ Channels, 96
- Readily releasable pool, 402
- Reazioni enzimatiche di fase I, 664
- Reazioni enzimatiche di fase II, 668
- Receptor Activity Modifying Proteins (RAMP), 144
- Receptor Ca²⁺ Channels (RCCs), 96
- Receptor-Operated Ca²⁺ Channels (ROCCs), 97
- Recettore, 63
 - classi, 63
 - coattivatori, 64
 - concetto di, 14
 - corepressori, 64
 - criteri di identificazione, 50
 - definizione, 7
 - generalità, 47
 - localizzazione, 71
 - proprietà, 47
 - siti di legame ortosterici, 7
 - struttura molecolare, 63
 - traffico cellulare, 72
 - trasporto cellulare, 72
 - turnover, 72
- Recettori,
 - AMPA, 478
 - ANP, 68
 - accoppiati alle proteine G, 66, 133
 - dimerizzazione, 136
 - interazione con proteine, 143
 - mutazioni, 136
 - organizzazione molecolare, 133
 - sito di interazione con le proteine G, 135
 - sito di legame per i mediatori chimici, 135
 - ad attività tirosino chinasi, 162
 - adrenergici, 420
 - a sette domini transmembrana, 144
 - BNP, 68
 - CAR, 231
 - CNP, 68
 - colinergici, 434
 - farmaci attivi sui, 436
 - con attività chinasi intrinseca, 68
 - con attività guanilato ciclasica, 68
 - con attività proteinchinasi, 65
 - Cys-loop, 120, 123, 127
 - decoy, 71, 184, 185
 - dei leucotrieni, 555
 - dei nucleotidi ciclici cGMP e cAMP, 120, 122, 126, 127
 - dei prostanoidei, 553
 - della famiglia IL-1/IL-18-R, 163
 - della famiglia TNF R, 164
 - di adesione cellulare, 173, 174
 - funzioni, 177
 - struttura, 174
 - di membrana, 64
 - di morte, 69, 340, 343, 345
 - dopaminergici, 423
 - farmaci attivi sui, 427
 - e citoscheletro, 72
 - e Homer, 71
 - ematopoietinici, 161
 - e matrice subsinaptica, 71
 - e PSD95, 71
 - e SAP90, 71
 - e Shank, 71
 - eterodimeri, 65
 - FXR, 231
 - GABA_A, 66, 461, 463, 464
 - extrasinaptici, 464
 - GABA_B, 461, 469, 470, 471
 - farmacologia, 469
 - GABA_C, 66
 - glutamatergici, 72
 - intracellulari, 64, 219
 - attività fisiologiche, 225
 - attività-extranucleare, 225
 - classificazione, 219, 221
 - controllo farmacologico, 225
 - degli androgeni, 229
 - degli attivatori della proliferazione perossisomiale, 230
 - degli estrogeni, 229
 - degli ormoni tiroidei, 230
 - dei glucocorticoidi, 227
 - dei mineralcorticoidi, 227
 - del progesterone, 229
 - dell'acido retinoico, 230
 - della vitamina D, 230
 - fattori di trascrizione ligando-regolati, 220, 224
 - organizzazione molecolare, 220
 - struttura, 219
 - intranucleari, 64
 - ionotropi, 65, 476, 477, 478
 - dell'ATP P2X, 123
 - istaminergici, 455, 456
 - modulazione farmacologica, 455, 456
 - LXR, 231, 379
 - metabotropi, 65, 479
 - muscarinici, 66, 436
 - farmaci attivi sui, 437
 - sottoclassi M1 e M2, 436
 - nicotinici, 66, 434
 - farmaci attivi sui, 436
 - muscolari, 435
 - neuronali, 435
 - omodimeri, 65
 - oppioidi, 506
 - distribuzione, 508
 - P1 per adenosina, 488
 - P2Y accoppiati a G-proteina, 490
 - per chemochine, 165
 - per citochine, 161, 162, 163
 - per eicosanoidi, 552
 - per endocannabinoidi, 517
 - per i fattori di crescita, 147
 - attivazione del segnale, 150
 - attività, 150
 - controllo farmacologico dell'attività, 157
 - e farmaci antitumorali, 159
 - organizzazione molecolare, 148
 - trasduzione del segnale, 150
 - per il GABA, 461
 - per il glutammato, 476
 - per il kainato, 478
 - per l'adesione cellulare, 68
 - per la matrice extracellulare, 65
 - per la proliferazione perossisomiale (PPAR), 372
 - per le citochine, 69
 - per l'insulina, 390
 - per le lipoproteine, 70
 - per NMDA, 478,
 - per purine, 488
 - per TNF, 69
 - PPAR, 230
 - modulazione farmacologica, 379
 - serotoninergici, 442
 - classificazione, 445
 - farmaci attivi su, 447
 - solubili, 183
 - azione agonista, 185
 - come agenti farmacologici, 187
 - effetti antagonisti, 185
 - meccanismi di generazione, 185
 - specifici, 328
 - SXR, 231
 - tirosin-chinasi, 148, 149
 - attivazione, 151
 - e tumori, 152
 - trasduzione del segnale, 153, 155
 - toll-like, 70
 - virali, 184
- Recettori-canale, 66, 96, 119
 - attivati da ligando, 66
 - canale ionico, 121, 124, 127, 128
 - classi, 119
 - distribuzione, 119
 - glutamatergici, 120, 121, 126, 127
 - localizzazione, 127
 - modulazione dell'attività, 129
 - GABAergico, 120
 - glicinergico, 120
 - nicotinico di torpedine, 124
 - nicotinico muscolare, 120, 126, 130
 - nicotinico neuronale, 120, 126
 - nicotinico omomero, 126
 - organizzazione molecolare, 120
 - P2X, 489
 - permeabilità ionica, 127,

- proprietà funzionali, 128
 - serotonergico, 120
 - siti di legame, 123, 126
 - subunità, 119, 120
 - topografia, 123
 - zona citoplasmatica, 128
 - Recettosoma, 71
 - Reclutamento leucocitario, 165, 167, 169
 - Recognition domains, 86
 - R&D: Research and Development, 26, 35
 - Regime terapeutico, 675, 680
 - correzioni, 689
 - Regioni "sushi", 469, 472
 - Regola di Lipinski, 609
 - Regolazione della trascrizione da stimoli extracellulari, 214
 - Regolazione epigenetica, 215
 - Regulators of G protein Signalling (RGS) 137
 - Relavancina, 584
 - Repaglinide, 266
 - Research and Development (R&D), 26, 35
 - Reserve pool, 402
 - Ret, 148, 149
 - Retigabina, 253, 268, 272
 - Retropepsina, 313
 - RGS: Regulators of G protein Signalling, 137
 - Rho, 134, 138
 - Rianodina, 282, 284, 287
 - Ribavirina, 591
 - Ricerca e sviluppo, 23, 24, 25, 26, 33, 34, 35
 - Ricerca
 - farmaceutica moderna, 23
 - farmaceutica, fasi della, 26
 - farmaceutica, spesa per, 25
 - preclinica, 23
 - strategie di, 25
 - Ricettario fiorentino, 11
 - Riduzioni, 667
 - Rifamicine, 576, 579
 - Riluzolo, 258, 269, 483
 - Rimedi omeopatici, 5
 - Rinforzo, 79, 80
 - Riprogrammazione, 192
 - RISC: RNA Induced Silencing Complex, 234
 - Rischio, valutazione del, 39
 - Risposta ai farmaci, 695
 - basi genetiche, 695
 - variabilità individuale, 695
 - Risposta immunitaria, 559
 - Risposta terapeutica, 699, 700
 - Risposte recettoriali ai farmaci, modulazione, 72
 - Risposte recettoriali, modulazione, 72
 - Ritonavir, 318, 324, 592
 - Rituximab, 570
 - Rivastigmina, 433
 - RNA come farmaco, 233
 - RNA Induced Silencing Complex (RISC), 234
 - RNA interference, 234
 - RNAP II, 205, 206
 - ROCCs: Receptor-Operated Ca²⁺ Channels, 97
 - Rodopsina, 133, 134, 138
 - Ror, 148
 - ROS, 364
 - formazione mitocondriale, 364
 - ruolo patologico, 367
- ## S
- S6 chinasi, 115
 - Saclofen, 471
 - Salicilati, 393, 597
 - Salsalato, 394
 - Sangliferina A, 370
 - Saquinavir, 318, 324
 - Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA), 99, 284, 285
 - SARIN, 433
 - Sauvagina, 497, 503
 - Scambiatore Na⁺/Ca²⁺, 285
 - distribuzione, 287
 - fisiologia e fisiopatologia, 287
 - modulazione farmacologica, 288
 - proprietà biofisiche, 287
 - struttura, 286
 - Scambiatore Na⁺/H⁺, 288
 - distribuzione, 289
 - farmaci attivi su, 290
 - proprietà biofisiche, 289
 - regolazione e fisiopatologia, 289
 - struttura, 289
 - SCF, 148, 149
 - Scienza traslazionale, 611
 - Scompenso cardiaco, 281, 288
 - Scopolamina, 431, 437, 438
 - butilbromuro, 438
 - Scuola salernitana, 10
 - Secondi messaggeri, 64, 66, 67, 68
 - Secrezione
 - costitutiva, 500
 - gastrica, 282
 - regolata, 499, 500
 - Segnale
 - catecolaminergico, 418
 - peptidergico, 501
 - serotonergico, inattivazione, 444
 - Segnali recettoriali, trasduzione intracellulare, 111
 - Selettine, 173, 174, 175, 176, 180
 - Selettività ionica, 246
 - SELEX: Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, 236
 - Self-renewal, 192
 - Semplici, 9
 - Sensibilizzazione, 8, 77
 - Sensitizzazione, 72
 - Sensore del voltaggio, 250, 251, 253, 265, 274
 - Sequenza segnale, 499
 - SERCA: Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase, 99, 284, 285
 - Serina proteasi, 312
 - Serina-treonina chinasi
 - SERM, 228, 229
 - Serotonina, 293, 294, 297, 298, 301, 302, 303, 306, 365, 366, 439, 440, 441, 442
 - distribuzione, 439
 - farmaci, 446
 - funzione, 439
 - liberazione, 444
 - metabolismo, 443
 - sintesi, 443
 - SERT, 298, 301, 302, 304, 305
 - SH2, 151, 152, 153, 155, 156
 - Signal Transducer and Activators of Transcription (STAT), 572
 - Signalling insulinico, modulazione, 392
 - Simpaticomimetici indiretti, 418
 - Sinapsi, 397, 405, 406
 - caratteristiche, 397
 - chimica, 397, 398
 - controllo farmacologico, 397, 407
 - eccitatoria, 400, 401
 - elettrica, 397, 398
 - GABAergiche, interventi farmacologici, 471
 - tripartita, 398, 399
 - Sinaptogenesi, 405
 - Sinaptopatie, 399
 - Sinaptotagmina, 434
 - Sincizio, 626, 627
 - Sindrome
 - da cessazione, 78
 - del QT lungo, 247, 271
 - di astinenza, 513
 - metabolica, 373, 376, 378, 382, 536
 - Single Nucleotide Polymorphisms (SNP), 696
 - Sintesi dei lipidi, controllo farmacologico, 373
 - Sintetasi degli acidi grassi (FAS), 377
 - inibitori, 377
 - siRNA: small interfering RNA, 21
 - SIRT1, 210, 211
 - Sirtuine, 210, 211
 - Sistema
 - catecolaminergico
 - nel sistema nervoso autonomo, 411
 - nel sistema nervoso centrale, 414
 - colinergico, 429
 - centrale, 430
 - farmaci attivi su, 436
 - non neuronale, 430
 - periferico, 430
 - dopaminergico, 415
 - endocannabinoide, 517,
 - farmacologia, 523

- funzioni biologiche, 520, 521
 - glutammatergico, 481
 - effetto di farmaci e tossici, 481
 - immune, modulazione farmacologica, 559
 - istaminergico, distribuzione, 449
 - farmaci attivi su, 456, 457
 - funzioni, 449
 - noradrenergico, 414
 - nervoso autonomo, 411, 412
 - oppioide, 505
 - serotoninergico,
 - distribuzione, 439
 - farmaci attivi su, 447
 - funzioni, 439
 - ruolo, 440
 - simpatico, organizzazione anatomica, 412
 - Siti allosterici, 7, 56, 131
 - Siti ortosterici, 7, 56, 131
 - SLC, 278
 - Small clear Synaptic Vesicles (SSV), 499
 - Small interfering RNA (siRNA), 21
 - SNARE, 434
 - SNAREs, 402, 408
 - SNP: Single Nucleotide Polymorphisms, 696
 - delle regioni codificanti, 696
 - perigenici, 696
 - random, 696
 - SOCCs: Store-Operated Ca²⁺ Channels, 97
 - SOD (superossido dismutasi), 365
 - Solfatazioni, 669
 - Soluti carrier, 278
 - Somministrazione dei farmaci
 - via buccale, 634
 - via cutanea, 635
 - via dermica o transcutanea, 637
 - via inalatoria, 636
 - via intramuscolare, 635
 - via intravascolare, 634
 - via orale, 631
 - via rettale, 634
 - vie enterali, 631
 - vie intracavitarie, 637
 - vie mucosali, 638
 - vie parenterali sistemiche, 634
 - Somministrazioni ripetute di farmaci, 679, 680
 - SoS, 153
 - Sostanza P, 430, 434
 - Sostanze d'abuso, 75, 79, 81
 - Sotalolo, 253, 257, 271
 - SP, 497
 - Spagirica, 11
 - Specialità farmaceutica, 4, 13
 - Specie reattive dell'ossigeno (ROS), 364
 - formazione mitocondriale, 364
 - Sperimentazione clinica dei farmaci, 35, 38, 42
 - fasi, 36
 - Spiazzamento dei farmaci, 650, 709
 - Spin-off, 20, 23
 - Splicing alternativo, 498
 - Squelene sintetasi, inibitori, 375, 376
 - Src, 178, 180
 - SREBP, 325
 - SSRI, 298, 303
 - SSV: Small clear Synaptic Vesicles, 499, 500
 - Stabilità metabolica, 609
 - Start-up, 20, 23
 - STAT: Signal Transducer and Activators of Transcription, 153, 155, 157, 572
 - Statine, 93, 374
 - Steady state, 679
 - Steroidi neuroattivi, 462
 - Stimolatori dell'azione di cGMP, 541
 - Store-Operated Ca²⁺ Channels (SOCCs), 97
 - Studi
 - di binding, 49
 - di proof of concept, 42
 - farmacogenetici, 704
 - osservazionali, 37
 - randomizzati, 37
 - tossicologici, 32
 - Subtilisina, 325
 - Succinilcolina, 433, 435, 437
 - Sulfamidici, 14, 577
 - Sulfonamidi, 583
 - Sulfoniluree, 266, 268, 269, 391
 - Sumoilazione, 85, 89
 - Sunitinib, 159
 - Superfamiglia del citocromo P450, varianti alleliche, 698
 - Superossido dismutasi (SOD), 365
 - Sviluppo di nuovi farmaci, 23
 - Syk, 178, 182
 - Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX), 236
- ## T
- TABUN, 433
 - Tachichinine, 497, 499
 - Tachiflasi, 8
 - Tacrina, 433
 - Talidomide, 563
 - Talina, 175, 176, 177, 179
 - Tamoxifene, 700
 - Target biologico, 24
 - Targeting, 643
 - Tassolo, 351
 - TATA-box Binding Protein (TBP), 205, 206, 207, 209, 212, 213
 - Taurina, 297, 298, 299
 - TBP: TATA-box Binding Protein, 205, 206, 207, 209, 212, 213
 - TBPS, 462
 - Telaprevir, 591
 - Telbivudine, 591
 - Telomerasi, 357
 - Telomeri, 357
 - Tenofovir, 592
 - Teoria del flogisto, 12
 - Teoria dell'occupazione, 54, 55
 - Terapia/e
 - anti-adesive, 179
 - avversiva, 83
 - cellulare, applicazioni, 195
 - di sostituzione, 83
 - genica, 17, 191, 198, 199
 - applicazioni, 200
 - ex vivo, 199
 - in vivo, 199
 - protocolli, 199
 - Terre sigillate, 10
 - Tetracicline, 576, 580
 - THDOC, 462
 - Theranostics, 30
 - THIP, 464
 - Tiagabina, 461
 - 2-tiazoletilamina, 456
 - Tiazolidinedioni, 380, 391, 393
 - Timopentina, 571
 - TIMP: Tissue Inhibitors of Metallo Proteases, 327
 - Tissue Inhibitors of Metallo Proteases (TIMP),
 - Tiocarbamati, 586
 - Tioperamide, 456
 - Tiopurinametiltransferasi, 701
 - Tiorfano, 318, 319
 - Tiotidina, 456
 - Tirosina chinasi, 148, 354, 359, 390
 - attività, 148
 - citoplasmatiche, 156
 - inibitori, 158, 159
 - non recettoriale, 156
 - struttura, 148
 - Tirosina fosfatasi, 157
 - TNF, 183, 186, 187, 315, 321, 323
 - Tocainide, 253, 257, 258
 - Tocilizumab, 570
 - Tolazamide, 266
 - Tolbutamide, 266
 - Tolleranza, 8, 77
 - agli oppiacei, 511
 - Topiramato, 258
 - Tossicocinetica, 608
 - Tossicodipendenza, 75, 78
 - da oppiacei, 515
 - farmaci, 83
 - ricerca, 82
 - stadi, 79
 - terapia, 82, 83
 - Tossicologia, 6, 24
 - Tossina
 - botulinica, 408
 - colerica, 137
 - della pertosse, 137
 - tetanica, 399, 408
 - tPA: tissue Plasminogen Activator, 327, 328, 329
 - Tissue Plasminogen Activator (tPA)
 - 327, 328, 329

TPSO traslocator protein, 465
 Tranquillanti minori, 16
 Transizione epitelio-mesenchimale, 173, 181
 Transsignalling, 169
 Trapianto
 – allogenico, 195
 – autologo, 195
 – eterologo, 195
 Trascrizione genica, 205
 Trasduzione del segnale, 65, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 153, 157
 Trasduzione intracellulare dei segnali recettoriali, 111
 Trasmissione
 – catecolaminergica, 411
 – colinergica, 429
 – GABAergica, 459
 – – farmacologia, 465
 – istaminergica, 449
 – nocicettiva, modulazione, 509
 – peptidergica, 498
 – purinergica, 485
 – serotoninergica, 439
 Trasportatore/i, 622
 – attivi, 246
 – ATP-dipendenti, 277
 – ATP-indipendenti, 277
 – dei farmaci, 702
 – del glucosio, 386
 – della colina 1 (CHT1), 432
 – della membrana plasmatica, 277, 293, 474
 – – Na⁺/K⁺-dipendenti, 294
 – – Na⁺/Cl⁻-dipendenti, 297
 – per il GABA, 300
 – per la dopamina, 303
 – per la serotonina, 301
 – per noradrenalina e adrenalina, 304
 – vescicolari, 293
 – – degli amminoacidi eccitatori, del GABA e della glicina, 307
 – – dell'acetilcolina, 397, 431, 434
 – – delle monoammine, 306
 – – H⁺-dipendenti, 305
 Trasporto contro gradiente, 294
 Trasporto passivo
 Trastuzumab, 359
 Trattamenti, personalizzazione, 43
 Trattamento cronico, 77
 TRH, 434
 Triaca, 10
 Trial clinico, 38
 – analisi statistica, 39
 – controllato, 37
 – ipotesi primaria, 38
 – randomizzato, 37
 Trigliceridi, biosintesi, 378

Trimetafano, 437
 Trimetoprim, 583
 Tripanosoma brucei, 93
 Triplice risposta di Lewis, 452
 Triprolidina, 456, 457
 Tripsina, 312
 TrkA, 113
 TrkA-B-C, 148, 149
 TRO40303, 370
 Trombopoietina, 162
 Trombospondina, 328
 Trombossano, 545, 548
 TSC2, 114
 TSPO, 370
 Tubocurarina, 437

U

Ubiquitina, 90, 314, 315, 319
 Ubiquitinazione, 85, 90
 UGT1A1, 701
 Ulcera, 283
 Up regulation, 73
 uPA, 327, 328, 329, 330
 UPE: Upstream Promoter Elements, 207, 208
 Upstream Promoter Elements (UPE), 207, 208
 Urokinase Plasminogen Activator (uPA) 327, 328, 329, 330
 Uso-dipendenza, 256, 257

V

VACHT: Vesicular Acetylcholine Transporter, 306, 307
 VACHT1: Vesicular Ach Transporter1, 431, 434
 Vagusstoff, 429
 Valproato, 253, 258
 Vareniclina, 437
 Variabilità farmacocinetica, 614, 631
 Vasculogenesi, 159
 VCAM.174, 175, 181
 VDAC, 369
 VEGF, 148, 149, 159
 VEGFR: fattore crescita endoteliale vascolare, 87
 Velocità
 – di assorbimento dei farmaci, 630
 – di distribuzione, 650
 – – fattori determinanti, 650
 Verapamil, 259, 260, 261, 263, 264
 Vesamicolo, 434
 Vesicole sinaptiche, 293, 294, 296, 303, 305, 306, 307, 397, 401
 – ciclo di eso-endocitosi, 402

Vesicular Acetylcholine Transporter (VACHT), 306, 307
 Vesicular Ach Transporter1 (VACHT1), 431, 434
 Vesicular GABA Transporter (VGAT), 306, 307
 Vesicular Monoamine Transporter (VMAT), 303, 306, 307
 VGAT: Vesicular GABA Transporter, 306, 307
 Vidarabina, 589
 Vie del piacere, 80
 Vie di somministrazione dei farmaci, 629
 Vie di somministrazione enterale, 631
 Vie di somministrazione parenterale, 634
 Vie di trasduzione del segnale, 154
 Vie serotoninergiche, 441
 Vinblastina, 51
 Vincristina, 351
 VIP, 430, 500, 503
 Vitronectina, 328
 VMAT: Vesicular Monoamine Transporter, 303, 306, 307
 VNT: Volume NeuroTransmission, 501
 VOCCs: Voltage Operated Channels, 96
 Voltage Operated Channels (VOCCs), 96
 Volume apparente di distribuzione, 623, 646, 647, 676, 689, 698
 Volume NeuroTransmission (VNT), 501
 Volume transmission, 71

W

Warfarin, 698, 705
 Wnt, 112

X

Xanomelina, 437

Z

Zaleplon, 463, 471
 Zanamivir, 590
 Zetabradina, 253, 273, 275
 Ziconotide, 253, 261, 264
 Zidovudine, 592
 Zigote, 192
 Zolpidem, 463, 465, 471
 Zonisamide, 258