

LA FARMACOLOGIA GENERALE

- Cenni sulle intossicazioni – pag. 55.
- Farmacocinetica – pag. 38.
- Farmacodinamica – pag. 37.
- I canali ionici – pag. 19.
- Interazioni farmaco-recettore – pag. 2.
- I recettori – pag. 4.
- I recettori-canale – pag. 6.
- Modulazione delle risposte recettoriali – pag. 16.
- Monitoraggio dei farmaci – pag. 53.
- Neurotrasportatori – pag. 29.
- Omeostasi del Ca^{2+} - pag. 11.
- Pompe e trasportatori – pag. 25.
- Problemi all'uso di farmaci – pag. 44.
- Recettori accoppiati alle proteine G - pag. 9.
- Recettori dei fattori di crescita – pag. 14.
- Recettori intracellulari – pag. 33.
- Secrezione – pag. 35.
- Studio dei farmaci – pag. 51.

INTERAZIONI FARMACO-RECETTORE RISPOSTA QUANTITATIVA AI FARMACI

Fumagalli – capitolo 4

Con il termine **farmaco** si intende una qualsiasi sostanza (endogena o esogena) che abbia attività biologica, non soltanto, quindi, quelle con attività terapeutica.

In genere il farmaco interagisce con macromolecole specifiche, definite **recettori**, ma non sempre è così. Un farmaco può agire su più tipi di recettori:

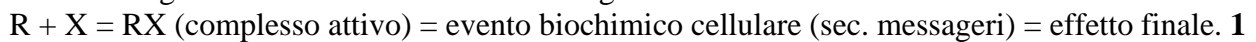
- Recettori classici di sostanze endogene.
- Enzimi (es. aspirina).
- Canali ionici (es. i calcio-antagonisti).
- Acidi nucleici (es. antibiotici).
- Proteine strutturali.

È da ricordare che più farmaci possono agire sullo stesso recettore in siti diversi, come le **BDZ**, i **barbiturici** e il **GABA**, tutti agenti sul recettore **GABA_A**.

Non tutti i farmaci si legano agiscono sempre su recettori, come ad esempio i disinfettanti, che agiscono in base alle loro proprietà acido-base. Molti farmaci si legano a proteine strutturali o plasmatiche per accumulo o trasporto, non esplicando la loro attività biologica.

Per molti farmaci l'attività biologica è dovuta alla formazione di legami con i propri recettori. È importante ricordare che, per motivi di semplicità, si prendono in considerazione reazioni all'equilibrio, ove il numero di complessi che si forma è uguale a quello che si dissocia. L'attività si svolge grazie a legami (ionici, ponti idrogeno, ponti idrofobici, forze di Van der Waals) che hanno una energia 20-200 volte più alta rispetto alle interazioni casuali fisiologiche, in modo da legare ligando e recettore. Da ricordare sono anche la specificità tridimensionale dei loro legami e le concentrazioni. Es. β_2 -agonisti sono broncodilatatori, ma in forti concentrazioni possono avere attività agonistica sui recettori β_1 -adrenergici del tessuto cardiaco.

La reazione generale di interazione recettore-ligando:



All'equilibrio la reazione ha andamento costante:

$$K_a = [RX] / ([R] [X]) \mathbf{2}$$

Ma si preferisce considerare $1/K_a$, che è la costante di **dissociazione** del complesso RX:

$$K_d = ([R] [X]) / [RX] \mathbf{3}$$

Questa costante è legata, a sua volta, dalle costanti **cinetiche** K_{on} e K_{off} , dipendenti dalla capacità del ligando di "trovare" il sito di legame e di allontanarsi da esso.

Dalla 3 si può ricavare R_t , che è il numero dei recettori:

$$R = (K_d[RX])/[R] \mathbf{4}$$

Definendo R_t come il numero totale dei recettori e data la 1 si ha:

$$R_t = RX + ((K_d [RX])/[X]) \mathbf{5}$$

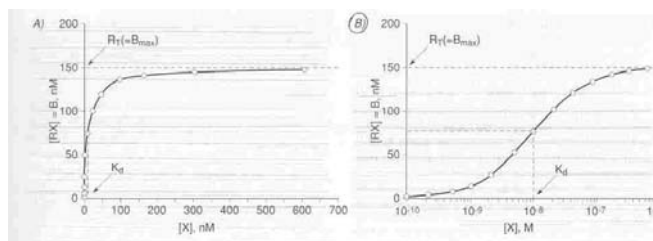
Riarrangiando la 4 si ha:

$$[RX] = ([X] [R_t]) / (K_d + [X]) \mathbf{6}$$

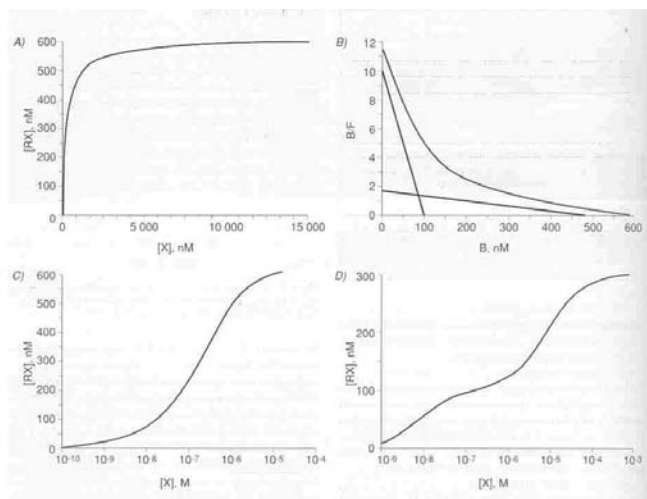
Posto $RX=B$, ovvero la quantità di recettore legato al ligando, e $R_t = B_{max}$, otteniamo:

$$B = ([X] B_{max}) / (K_d + [X]) \mathbf{7}$$

Questa legge, formalmente uguale alla legge di **Michaelis-Menten**, prende il nome di **Isoterma di Langmir**, rappresentata da una iperbole rettangolare o da una sigmoide in un grafico semi-logaritmico. In questa curva B_{max} corrisponde al valore dell'asintoto cui la curva tende, mentre K_d è la concentrazione necessaria per saturare il 50% di tutti i siti recettoriali liberi.



Si verifica, spesso, che i recettori siano costituiti da diverse sottoclassi, ciascuna presentante specifiche diverse. Ciò comporta una differenza nella rappresentazione dell'Isoterma, legata alla presenza di uno o più punti di flesso, in base al numero dei sottotipi di recettori cui il ligando si lega.



Questa curva rappresenta il livello di saturazione dei recettori in funzione della concentrazione del farmaco. Con questa curva si possono analizzare i comportamenti di diversi farmaci. Alcuni farmaci possono competere con altri farmaci in maniera competitiva e non competitiva. Un farmaco **competitivo** è quello che tende a “strappare” il legame di un altro farmaco dal recettore cui è affine; in base alle concentrazioni dei farmaci, uno dei due può avere la meglio (in genere quello a concentrazione più alta); questi farmaci instaurano un legame di natura non covalente con il recettore e la isoterma del farmaco che subisce la competizione tenderà a spostarsi verso dx. Un farmaco **non-competitivo** instaura, invece, un legame di natura covalente (variabile nel tempo) con il recettore e non renderà possibile il legame. L'isoterma, quindi, non si apprezza, o si apprezza poco, in base allo “spiazzamento” subito dal farmaco.

La relazione tra concentrazione (in peso per Kg o in mM o Mg/l) di un farmaco e la risposta prende il nome di **curva concentrazione-risposta** in vitro e **curva dose-risposta** in vivo. In generale gli effetti di un farmaco possono essere:

- Graduali: continui nel tempo e direttamente proporzionali alle concentrazioni del farmaco.
- Non misurabili di continuo: classificate e ordinate con uno “score”, un punteggio cui corrisponde una concentrazione di farmaco specifica.
- Tutto o nulla, **quantali**: l'estremo del caso sopra-citato, con la presenza o assenza di effetti.

La relazione tra concentrazione/dose ed effetto è un grafico ben specifico che può essere studiato. Questa curva presenta, inoltre, altre variabili. La posizione sull'asse delle ascisse determina la **potenza** di un farmaco, che è, in genere la capacità di determinare effetti in base ad una determinata concentrazione. In genere si assume come valore di riferimento della potenza quella concentrazione di farmaco che genera un effetto pari al 50% del massimale, definito **EC₅₀** (in vitro) o **ED₅₀** (in vivo) – spesso si esprime con un'espressione logaritmica secondo l'espressione **pD₂ = -logED₅₀**. Secondo la **teoria dell'Occupazione** (Clarke – 1933), l'effetto di un farmaco è direttamente proporzionale al grado di occupazione del recettore, per cui si ottiene, in una reazione di equilibrio, che ED₅₀ corrisponde alla **K_d** della reazione $R+X=RX$; minore è la ED₅₀, maggiore sarà la potenza del farmaco.

Farmaci che agiscono sullo stesso recettore hanno curve dose-effetto parallele, con diversa ED_{50} , legata alle diverse potenze; una curva, inoltre, è importante in base alla pendenza del suo tratto rettilineo; meno è ripida la curva, minori saranno le variazioni di effetto in base a piccole variazioni di concentrazioni.

In pratica clinica ha maggiore importanza, però, l'**efficacia** di un farmaco, che è l'entità massima dell'effetto che può indurre; un farmaco può avere diversa potenza, ma uguale efficacia.

La teoria dell'occupazione, però, non spiega tutti i fenomeni farmacologici:

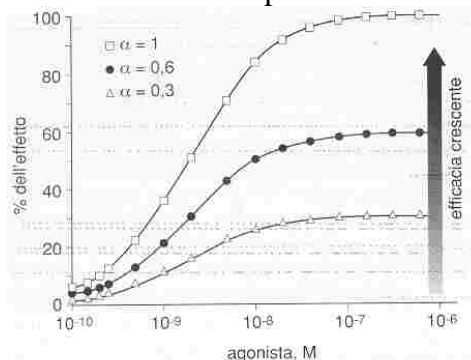
Spesso curva dose-risposta e curva interazione farmaco-recettore non coincidono: la curva dose-risposta può trovarsi a sx o a dx della curva farmaco-recettore. Se si trova a sinistra, si ha una risposta più alta rispetto alla quantità di interazioni farmaco-recettore; ciò avviene per la presenza di amplificazione di segnali a valle, e gli altri recettori si comportano da **recettori di riserva**. Se la curva dose-effetto è spostata a dx rispetto alla curva farmaco-recettore, è perché il recettore è presente in concentrazioni non trascurabili, quindi c'è bisogno che il farmaco si leghi molto prima di avere il suo effetto.

Esistono farmaci che, pur occupando gli stessi recettori, hanno effetti minori o completamente differenti da quelli aspettati: questo è il caso dei cosiddetti farmaci **agonisti** e **antagonisti**.

- **Agonisti**: sono farmaci che, oltre a rispondere alla teoria dell'occupazione, devono rispondere alla teoria dell'efficacia. Secondo la prima il requisito fondamentale è il legame farmaco-recettore, per la seconda, invece, altro requisito importante è l'**attività intrinseca**, ovvero come il farmaco dà inizio all'attività biologica. Secondo queste due teorie gli agonisti possono essere:

- **Pieni**: per ogni legame si avvia una risposta.
- **Parziali**: si legano ai recettori ma hanno una minore capacità di avviare le risposte metaboliche.

L'efficacia dei farmaci agonisti varia e ciò si rispecchia con curve dose-effetto sempre più alte.



- **Antagonisti**:

- **Funzionale**: blocca una via che contrasta quella di un agonista specifico. Es. è l'azione anticontratturante dei β_2 -agonisti che contrasta l'azione broncocontratturante dell'istamina.
- **Sormontabili**: sposta la curva effetto-dose parallelamente verso dx ma sono competitivi, dunque aumentando la concentrazione dell'agonista si ottiene l'effetto voluto;
- **Insormontabili**: sono non-competitivi e bloccano il recettore per un agonista e deprime l'effetto dell'agonista.

Secondo la teoria dei **recettori costitutivamente attivati**, si ha la presenza di recettori esistenti in 2 possibili configurazioni, R ed R'. la forma R è in uno stato inattivo e il legame con X non porta a nulla, mentre R' è in uno stato attivo, quindi il legame con X' porta ad una attivazione della via metabolica specifica. Ne consegue l'esistenza di un'altra classe di farmaci, detti **agonisti inversi**, legati alla capacità di legarsi al recettore con lo stato R e non R', deprimendo l'azione (si legano sempre come agonisti, ma tendono a bloccare la via).

In tutti questi casi ED_{50} è sempre diversa da K_d .

I RECETTORI

Fumagalli – capitolo 5

Una sostanza endogena o un farmaco, quindi, per determinare una risposta metabolica, devono essere legati a specifici **recettori**. Queste molecole possiedono capacità di “scegliere” specificamente il proprio ligando e attivare specifiche risposte metaboliche (non basta il solo legame, di fatti molecole plasmatiche e tissutali come l’albumina non determinano risposte metaboliche).

Ogni recettore è presente in diversi **sottotipi** – vedi capitolo 4 – e ciò comporta una serie di risposte diverse per ogni recettore, una sorta di **personalizzazione** della cellula. Ogni recettore determina una risposta metabolica che varia nel tempo, in base alle differenze specifiche tra ogni recettore, ed in base ai meccanismi di controllo:

- A livello del ligando: la secrezione dei ligandi (es. ormoni) può essere inibita mediante processi di feedback; ogni ligando può subire processi metabolici di inattivazione o recupero.
- A livello della interazione: il legame tra ligando e recettore si basa sulla K_d del sistema $R+X=RX$ – vedi capitolo 4. Risposte brevi hanno K_d tendenzialmente molto alte, segno di scarsa affinità recettoriale (es. interazioni ligando-canali ionici); viceversa interazioni lunghe hanno K_d molto basse, sinonimo di alta affinità recettoriale (es. interazioni ligando-recettore per risposte metaboliche tipo differenziamento cellulare). Le K_d variano da 10^{-3} (interazioni lunghe) a 10^{-12} (interazioni brevi).
- A livello recettoriale: **desensitizzazione** del recettore (riduzione della capacità del recettore di legare un ligando in base alla modificazione di alcune subunità) ed **up/down- regulation** (aumento/diminuzione della concentrazione dei recettori da parte di meccanismi cellulari). In alcuni casi si può ottenere una produzione **ex-novo** di recettori diversi o di diversi sottotipi in modo da regolare la risposta.
- A livello di controllo della risposta: spesso i sistemi biologici attivati dall’interazione farmaco-recettore possiedono vie metaboliche atte al blocco del segnale di partenza (mediante chinasi, fosfatasi - blocco della conduttanza di canali ionici) così da diminuire il segnale.

I recettori sono divisi in due gruppi, quelli di membrana e quelli intracellulari.

I recettori di **membrana** sono specifici per sostanze idrosolubili (neuropeptidi, ormoni proteici, sostanze che non passano la membrana cellulare) e sono divisi in 6 classi principali:

- Recettori-canale: sono recettori la cui risposta al ligando consiste nella loro apertura (o nell’aumento della conduttanza) per uno ione. In questo gruppo figurano i recettori **GABA_a**, i recettori **5HT₃**, i recettori **nicotinici**, i recettori per la **glicina**, i recettori **ionotropi per il Glutammato**, i recettori **P_{2x}** per le Purine. Sono composti da 4 o 5 subunità, α , β , γ e δ , che, a loro volta, attraversano la membrana 4 volte mediante 4 subunità idrofobiche, denominate M1-4. Ogni subunità si lega con le altre in modo da formare un canale, caratterizzato dalle subunità M2 rivolte nel lume. I recettori-canali presentano una subunità specifica, la α , che determina il sito per il ligando, anche se con l’aiuto di altre subunità, come la β . Esistono, inoltre, anche altri siti, denominati **allosterici**, che legano altre molecole così da modulare le risposte del recettore-canale quando interagisce con il suo ligando. Altre molecole, infine, possono legarsi ad altri siti, come ad esempio all’interno del canale, in modo da alterarne il funzionamento. Le risposte di questi recettori sono “brevi”.
- Recettori accoppiati a proteine G: sono recettori la cui funzione si basa sull’attivazione di proteine G. I recettori sono i classici **7TMS** e il dominio intracellulare tra i transmembrana 5 e 6 è quello specifico per l’interazione con le proteine G. Stabilizza l’interazione farmaco-recettore, si ha una modificazione che determina attivazione delle proteine G. Queste sono così denominate perché hanno la capacità di legare GTP e GDP. Sono composte da 3 subunità, α , β e γ , e solo α ha attività biologica. La subunità α ha attività catalitica sul GTP e mentre vi è legato, attiva altri effettori enzimatici con attivazione delle vie dei secondi messaggeri (adenilato ciclasi e fosfolipasi C). Da qui in poi si ha una serie di attività enzimatiche a cascata che determinano le caratteristiche risposte “lunghe” di questi recettori.

Esistono molti farmaci che possiedono sia recettori-canali che recettori accoppiati alle proteine G, come il GABA, in modo tale che si possano avere risposte brevi e lunghe.

- Recettori con attività tirosin-chinasica: questi recettori sono specifici per fattori di crescita e interleuchine. Hanno una catena polipeptidica che attraversa una sola volta la membrana cellulare. Quando si lega il farmaco, questi recettori si autofosforilano e si attivano fosforilando residui in tirosina. Molti di essi ed il loro funzionamento è legato alla patogenesi dei tumori, se sono costitutivamente attivi.
- Recettori per l'adesione cellulare: sono caratterizzate per il fatto che la loro attività biologica consiste nella trasduzione dei segnali che comprendono la posizione della cellula e la sua mobilità, la necessità di proliferazione, sia in condizioni fisiologiche (infiammazione) che in quelle patologiche (metastatizzazione). Questi recettori sono divisi in sottofamiglie (CAM, cadherine, integrine, selectine, Ig) e sono legate all'attivazione di diverse vie metaboliche (attivazione di tirosin-kinasi, attivazioni di enzimi, apertura di canali).
- Recettori per le citochine: le citochine sono fattori pleiotropici soprattutto coinvolti nella regolazione della differenziazione e proliferazione dei tessuti linfatici ed emopoietici. Ogni recettore appartiene a superfamiglie specifiche; ogni recettore, infatti, possiede un dominio specifico per il riconoscimento della citochina ed un dominio, in comune con altri recettori della stessa superfamiglia, specifico per l'attivazione di una via metabolica; ciò è alla base del meccanismo di **ridondanza** delle citochine.
- Recettori con attività guanilciclasica: sono recettori poco diffusi nel corpo umano. Sono stati scoperti recettori per i **peptidi natriuretici atriali A, B e C**, chiamati **GC-A**, la cui distruzione comporta ipertensione Na^+ resistente e cardiomegalia, ed un recettore per la enterotossina di **E.Coli** (GC-C), la cui distruzione comporta resistenza alla diarrea da infezione con E.Coli. Questi recettori sono costituiti da una singola catena e quando sono legati con il farmaco specifico, sintetizzano il secondo messaggero **cGMP**. Sono presenti, inoltre, siti di modulazione allosterica.

I RECETTORI-CANALE

Fumagalli – capitolo 6

L'interazione tra farmaco e recettore-canale determina un cambiamento conformazionale intrinseco del recettore. Gli ioni, quindi, possono attraversare il canale attraverso secondo il proprio gradiente chimico, determinando, così, una variazione di potenziale elettrico di membrana: ha inizio, così, la risposta metabolica. Ogni recettore-canale è presente in zone ben precise sulla membrana, in modo da svolgere la sua azione. Sono, quindi, presenti sulle membrane **post-sinaptiche** per determinare l'effetto intrinseco, sulle membrane **pre-sinaptiche** per determinare automodulazione del segnale e possono trovarsi sulle membrana **extra-sinaptiche**.

I recettori canale sono divisi 4 superfamiglie:

- Recettori nicotinici: rec. nicotinic muscolare e neuronale, rec. GABA_A , rec. della glicina e della serotonina.
- Recettori ionotropici del glutammato: NMDA, AMPA e Kainato.
- Recettori di nucleotidi ciclici: rec. di cAMP e cGMP.
- Recettori ionotropici dell'ATP: P2X.

Vedi tabella 6.1

I recettori canale riconoscono tutti ligandi di natura extra-cellulare, ad eccezione della superfamiglia dei recettori per cAMP e cGMP, che riconoscono ligandi intracellulari (spesso secondi messaggeri di altre vie di trasduzione).

L'entità delle risposte cellulari indotte dai recettori-canale è modulata da 2 variabili: differenza di potenziale transmembranario e durata della stimolazione. In genere il flusso di ioni varia proporzionalmente in base alla relazione corrente/voltaggio. I recettori-canale sono, infatti, poco specifici per lo ione permeante. Di conseguenza, mentre Na^+ può entrare nella cellula, K^+ può

uscirne. I flussi ionici, inoltre, sono regolati dal **punto di inversione** dei canali. La conduttanza di un canale verso uno ione varia a seconda del potenziale di membrana. Ad esempio lo ione Cl^- entra nella cellula finché il potenziale è superiore ai -70mV ; qualora il potenziale scenda al di sotto del punto di inversione, tra -80 e -100mV , questi tenderà ad uscire dalla cellula.

Attivazioni **continue**, inoltre, possono determinare il fenomeno della **desensitizzazione**, ovvero questi possono entrare in uno stato non-conduttivo. Il fenomeno della desensitizzazione è legato a mediazioni mediante recettori pre-sinaptici, modificazioni su siti di fosforilazione endogeni, mediante interazioni di ligandi su siti di modulazione allosterica. Ogni recettore-canale può, inoltre, cambiare la propria attività biologica in base alla natura del farmaco che vi si lega (agonisti, agonisti parziali, antagonisti etc.).

SUPERFAMIGLIA DI REC. NICOTINICI

Il recettore **nicotino** per l'acetilcolina è il prototipo dei recettori di questa superfamiglia. A questa classe appartengono i recettori **GABA_A**, **nicotinici muscolari** e **neuronal**, **Gly-R** e **5HT₃**. I recettori di questa classe sono un **eteropentamero** costituito da 5 subunità. Ogni subunità presenta un dominio N-terminale extra-cellulare, caratterizzato da un'ansa di 13 a.a. tra due residui di Cys (128 e 142), formanti un ponte disolfuro, fondamentale per la struttura di ogni subunità. A questo dominio extracellulare seguono 4 domini transmembrana (M1-4), cui segue, infine, il dominio citoplasmatico COO^- terminale. Tra i domini M3 ed M4 è presente un ponte polipeptidico molto lungo. Per ogni subunità il dominio M2 è quello caratteristico per la formazione del lume del canale ionico. Questi domini M2 sono catene proteiche anfipatiche che presentano restringimenti in 3 punti, formando 3 anelli, che presentano a.a. carichi. Di questi il più importante è quello centrale che regola la specificità e la conduttanza del canale. Questi variano per ogni canale.

I recettori-canale di questa classe sono formati da 5 subunità proteiche e sono eteropentameri.

Il prototipo di questa famiglia di recettori è quello **nicotino AChR**: il recettore è un eteropentamero di 300kDa (subunità: $2\alpha 1$, $1\beta 1$, 1ϵ (o 1γ), 1δ). Questo ha forma di imbuto. La parte extracellulare sporge dalla membrana per circa 6 nm ed il canale ha un diametro interno di circa 2nm. In corrispondenza dell'attraversamento della membrana il recettore si restringe: questa è la "porta".

Questo recettore è permeabile ai cationi e possiede in questo punto di restrizione a.a. carichi negativamente; AChR è, infatti, permeabile per Na^+ , K^+ e Ca^{2+} . In base alle subunità, varia la specificità. Il recettore nicotino, infatti, per essere permeabile al Ca^{2+} necessita della subunità **$\alpha 7$** . Dopo questo restringimento il recettore si riallarga. Nella porzione citoplasmatica sono presenti importanti siti di fosforilazione (P) per la modulazione dell'attività.

Mel SNC sono presenti isoforme diverse dell'AChR che differiscono in termini di selettività; il più diffuso ha le isoforme $\alpha 4$ e $\beta 2$, sensibile ad Ach e Nicotina, con conduttanza per Sodio e Potassio, ma non bloccabile dalla **α -bungarotossina**. In diverse aree del SNC è espressa la subunità $\alpha 7$, che conferisce permeabilità per Calcio e rende AChR bloccabile dalla α -bungarotossina.

La subunità $\alpha 1$ è quella fondamentale per il legame con ACh per la presenza di 2 residui di Cys in posizione 192 e 193. Altri residui importanti sono presenti in altre zone della subunità $\alpha 1$, anche a distanza, anch'esse implicate per il legame con il ligando specifico. Le subunità γ e δ sono ulteriormente coinvolte nell'interazione farmaco-recettore e interagiscono ciascuna con una delle due subunità $\alpha 1$: risulta ovvio che i siti di legame per il farmaco sono 2 con specifiche proprietà.

Nella giunzione muscolare di rana l'interazione tra ACh e recettore determina l'ingresso di 10.000 ioni/msec determinando una depolarizzazione di $0,5\ \mu\text{V}$ per ogni recettore che si attiva.

Il dominio intracitoplasmatico compreso tra le subunità M3 e M4 presenta molti siti di fosforilazione, fondamentali per i meccanismi di desensitizzazione. La fosforilazione di questi siti, per esempio ad opera della PKA, determina un aumento delle aperture casuali del recettore. Il trattamento con **agonisti non-idrolizzabili** (succinilcolina) o con farmaci **inibenti la degradazione di ACh** (anticolinesterasici) può determinare ultrastimolazione del recettore e conseguente

desensitizzazione. Molti cortisonici determinano inibizione di AChR e bisogna stare attenti durante trattamenti di patologie come la Miastenia Grave.

Un altro recettore importante di questa classe è il recettore **GABA_A**:

A differenza del recettore nicotinico, questi è costituito da diverse subunità quali 2 α , 2 β e 1 γ . Il sito di legame con il GABA è costituito dalle subunità α in collaborazione con le subunità β . Anche questi, quindi, presenta 2 siti di legame. Anche il recettore GABA_A presenta un punto di restrizione e l'**anello centrale** è composto da a.a. non carichi per la conduttanza agli anioni.

Il rec. GABA_A, inoltre, può subire processi di modulazione. In vitro, infatti, bastano subunità α e β per ottenere un canale funzionante, ma per la modulazione con le **BDZ** è necessaria la presenza della subunità γ . Le BDZ modulano, infatti, il legame tra il GABA e la subunità β del recettore. Altri farmaci, come i **barbiturici** regolano il processo di apertura del canale.

Recettore **Gly-R**:

Il recettore per la glicina è simile al recettore nicotinico. Nel punto di restrizione del canale presenta a.a. non carichi per la conduttanza di anioni. Anche questo recettore può essere modulato. Nel midollo spinale, dove è alta la sensibilità per la **stricnina**, si ha costantemente l'espressione della subunità $\alpha 1$; nelle zone più rostrali, invece, ove la sensibilità per la stricnina è bassa, sono maggiormente espresse le subunità $\alpha 2-3$.

Recettore **5HT₃**:

Il recettore per la serotonina è simile ad AChR, possedendo, inoltre, a.a. carichi negativamente nel punto di restrizione per la conduttanza ai cationi.

SUPERFAMIGLIA DEI REC. GLUTAMMATERGICI

A questa classe appartengono i recettori ionotropi per il **Glutammato**, comprendente i recettori **AMPA**, **Kainato** e **NMDA**. Ogni subunità è costituita da una regione N-terminale extra-cellulare di circa 400 a.a. che si continua con 4 domini transmembrana (M1-4) ed un dominio COO⁻terminale intracellulare. Queste subunità possiedono il dominio M2 che non attraversa interamente la membrana, ma si ripiega in essa formando la cosiddetta **zona P**, che corrisponde al lume del canale e ad una "porta" fisica che si "apre" all'attivazione del canale. Il recettore è **tetrameric** e può essere otero/omo-oligomero.

Il sito di legame per gli a.a. eccitatori è extra-cellulare. In corrispondenza della zona N-terminale, si ha un dominio, detto **zona X**, che non ha attività di riconoscimento; dopo questo si ha un dominio detto **S1** cui segue M1. Dato che M2 è intracellulare, il dominio tra M3 e M4 corrisponderà ad un altro dominio detto **S2**. S1 ed S2 determinano, così, una tasca profonda in cui si lega il farmaco.

Anche questo recettore è a forma di imbuto, con i domini M2 che determinano il canale e che presentano un **punto di restrizione** che, per la specificità di a.a., determina variazioni della permeabilità. I recettori **Ampa** e **Kainato**, infatti, presentano a.a. quali glutamina (Q) ed arginina (R) che determinano alta permeabilità per Sodio e Calcio; i recettori **Kainato**, invece, presentano un residuo di asparagina (N) che ne determina sia l'alta permeabilità al calcio, sia la possibilità del **blocco al Mg**.

I recettori NMDA si aprono, però, sia con un a.a., ma necessitano di una parziale depolarizzazione per attivarsi completamente.

RECETTORI DEI NUCLEOTIDI cAMP e cGMP

Questi recettori sono aperti da ligandi intracellulari, omologhi ai canali voltaggio-dipendenti. Le subunità hanno entrambe le regioni N/COO⁻terminali intra-cellulari. Possiedono, inoltre, 6 regioni transmembrana M1-6, ed una **regione P** tra M5 ed M6; analogamente con i recettori glutamatergici, la regione P forma una "porta" sul canale ionico. I recettori sono eterooligomeri formati da quattro subunità. Questi recettori hanno il sito di legame composto da 120 a.a., omologo alle regioni che legano i nucleotidi ciclici in altre proteine, come le proteine chinasi cAMP e cGMP dipendenti.

RECETTORI IONOTROPICI DELL'ATP P2X

Sono state clonate finora solo sette subunità di questi recettori (P2X₁₋₇). Queste subunità hanno le regioni N/COO⁻-terminale intracellularmente e possiedono due domini transmembrana M1-2 ed una larga regione extracellulare. Questi recettori sono omoooligomerici costituiti da 3 subunità. Il sito di legame è compreso sulla regione extra-cellulare.

RECETTORI ACCOPPIATI ALLE PROTEINE G

Fumagali – capitolo 7

Circa l'80% di tutti gli ormoni, neurotrasmettitori e neuromodulatori che regolano e interazioni cellulari (primi messaggeri), inducono risposte mediante interazioni con recettori accoppiati alle Proteine G. I ligandi sono le amine biologiche, gli ormoni glicoproteici e persino i fotoni (sul pigmento visivo rodopsina).

Questi recettori hanno una struttura comune. Sono i cosiddetti recettori **7TMS**; presentano un lungo dominio N-terminale extracellulare e 7 domini transmembrana, cui fa seguito il dominio COO⁻ terminale intracellulare. È ovvia la presenza di tre loop citoplasmatici che collegano i domini transmembrana di cui il terzo, insieme al dominio COO⁻ terminale, è fondamentale per la propria variabilità in a.a., che conferisce specificità d'azione.

Le interazioni farmaco-recettore è molto variabile:

- Catecolamine, istamina, serotonina, ACh e fotoni: i 7 domini transmembrana formano una tasca nello spessore della membrana per il legame del farmaco; fondamentali per i recettori α - β adrenergici sono i domini transmembrana III e V.
- Neuropeptidi: l'interazione avviene tra il farmaco ed un sito di legame posto in corrispondenza della porzione extracellulare del recettore.
- Ormoni glicoproteici (LH, FSH, TSH): il sito di legame è posto sul dominio N-terminale del recettore; il ligando è "indirizzato" sul recettore grazie a questa interazione.
- Glutammato: il glutammato si lega al dominio N-terminale e il cambiamento conformazionale che questi subisce determina un'interazione fisica con il recettore metabotropico; è necessario, quindi, sia l'interazione del glutammato che del dominio N-terminale.
- Trombina: questa proteasi determina la rottura del dominio N-terminale in un punto specifico; è questo frammento che determina l'attivazione del recettore.

Mutazioni a carico di questi recettori sono alla base di patologie: adenomi tiroidei per il recettore del TSH e pubertà precoce nei bambini per il recettore del LH. Queste mutazioni sono dette **attivanti**, perché il recettore risulta costituzionalmente attivato, ed è interessato sempre il **terzo loop citoplasmatico**. Altre mutazioni, che non interessano il terzo loop citoplasmatico, sono dette **inattivanti**; un esempio è il recettore per la **vasopressina** nel diabete insipido nefrogeno congenito.

Le **proteine G** sono così dette per la capacità di legare nucleotidi guanilici. Questi recettori sono eterotrimeri composti da subunità α , β e γ , in ordine decrescente per il peso molecolare. Le proteine G sono associate al recettore 7TMS mediante la subunità α che interagisce con il terzo loop citoplasmatico ed il dominio COO⁻-terminale dei recettori.

Queste hanno un funzionamento specifico:

- Stato inattivo: complesso $\alpha\beta\gamma$ -GDP.
- Interazione farmaco-recettore: GTP si sostituisce a GDP.
- Legame di GTP: complesso $\beta\gamma$ libero e complesso α -GTP libero; questi sono attivi e possono interagire con i propri substrati.
- L'azione di complessi dura finché non si esplica l'azione GTPasica intrinseca della subunità α .
- α -GDP si riassocia al complesso $\beta\gamma$ e si interrompe il ciclo.

L'attività delle G-proteins può essere amplificata perché un recettore può attivare più G-proteins; l'idrolisi di GTP, inoltre, può avvenire anche dopo alcuni secondi dalla stimolazione, cosicché si ha attivazione di molte vie di trasduzione.

L'attività delle G-proteins e dei complessi α -GTP e $\beta\gamma$ è legata sia all'attività GTPasica intrinseca della subunità α , sia alla presenza di **RGS** (regulators of G-proteins signaling), proteine che determinano l'accelerazione dell'attività GTPasica intrinseca.

Il farmaco che determina l'attivazione dei recettori 7TMS è definito **primo messaggero**; a questo legame segue, come abbiamo visto, l'attivazione delle proteine G cui fa seguito la formazione di **secondi messaggeri**, ovvero mediatori che avviano le risposte metaboliche. I secondi messaggeri, per essere tali, debbono generare risposte che senza di essi non ci sarebbero e la risposta deve essere transitoria e dipendente dalla durata dello stimolo che l'ha generata.

I secondi messaggeri sono **cAMP** e **DAG/IP₃**, generati da enzimi specifici quali l'**adenilato ciclasi** e la **fosfolipasi C**.

L'attività specifica delle proteine G risiede nelle subunità α . Ne esistono, infatti, diversi sottotipi. Queste subunità presentano 5 domini altamente conservati detti G1-5 che determinano il sito di legame con i nucleotidi guanilici. Per ogni subunità α , il dominio COO⁻ terminale è fondamentale per la specificità d'azione. Le subunità α sono divise in tre classi:

- α_s : stimolazione dell'adenilato ciclasi legata ai recettori β -adrenergici e al recettore per TSH.
- α_{1-3} e α_o : inibizione dell'adenilato ciclasi legata ai recettori α_2 -adrenergici e per la somatostatina.
- α_i : stimolazione della fosfolipasi C legata ai recettori M₁ muscarinici e per il TRH.

Le subunità α sono bersaglio di alcune tossine batteriche: la tossina della pertosse e la tossina colerica. La tossina della **pertosse** ha attività ADP-ribosilante sulle subunità α_i , mentre la tossina **colerica** ha attività ADP-ribosilante sulle subunità α_s .

Anche mutazioni possono coinvolgere le subunità α , determinando importanti patologie, come lo **pseudoipoparatiroidismo di tipo I** (osteodistrofia ereditaria di Albright), legata alla resistenza al PTH (e TSH, LH, FSH e glucagone): la subunità colpita è la α_s che è resa inattiva.

Anche i complessi $\beta\gamma$ hanno un ruolo importante, sia circa la regolazione dell'attività (protezione dall'attivazione di α -GTP senza il legame del ligando), sia perché agiscono anch'esse su bersagli specifici, come canali al Ca²⁺ o le chinasi MAP o ERK.

Sistema dell'**adenilato ciclasi**.

L'adenilato ciclasi è un enzima ubiquitario. È composto da un dominio intracellulare N-terminale e due loop citoplasmatici C1 e C2 tra i quali sono interposti due domini transmembrana M1 e M2, composti da 6 domini transmembrana ciascuno. L'attivazione del complesso α_s -GTP determina l'attivazione dell'adenilato ciclasi che produce **cAMP** che, a sua volta, si lega a diversi substrati. Il più importante è la **PKA**, composta da due subunità, una catalitica ed una regolatoria. La PKA necessita il legame di 4 molecole di cAMP per essere attivata. Una volta attiva la subunità catalitica avvia una serie di risposte. Queste risposte sono regolate dalla presenza di enzimi quali **fosfatasi** che rimuovono i gruppi fosfato attivanti della PKA. La loro regolazione è, però, sotto il controllo della PKA. Questa, infatti, attiva mediante fosforilazione gli inibitori delle fosfatasi. Quando cessa il segnale chimico, si ha una diminuzione dell'attività della PKA con ritorno delle attività normali cellulari.

Le fosfatasi sono spesso bersagli di farmaci. Ad esempio le **metilxantine** sono usati in terapia broncodilatatoria; altri farmaci come il **milrinone** e l'**amrinone** sono molto attivi nel muscolo cardiaco: l'aumento di cAMP che determinano comporta fosforilazione ed apertura di canali del Ca²⁺ che determina, a sua volta, effetto **inotropo positivo**.

Sistema del **fosfoinositidi**

La **fosfolipasi C**, attivata dalle proteine G mediante la subunità α_i , induce l'idrolisi del **PIP₂** in **DAG** e **IP₃**. Questi agiscono come secondi messaggeri mediante diversi bersagli. Esistono diverse

isoforme di fosfolipasi C e sono tre tipi: β , γ e δ , ognuno con un meccanismo d'azione ben specifico.

La **fosfolipasi C β** (PLC β) agisce mediante l'intervento della proteina **G $_q$** . La subunità α di questa G-protein è legata alla membrana e PLC β **trasloca** sulla membrana ed è attivata.

La **fosfolipasi C γ** (PLC γ) viene attivata, invece, mediante attivazione di recettori per fattori di crescita quali PDGF, EGF e FGF. I loro recettori sono, infatti, dimeri con attività autofosforilasica. Una volta attivi, fosforilano residui in tirosina ed uno dei loro bersagli è la PLC γ che viene attivata.

La **fosfolipasi C δ** (PLC δ) ha una modalità di attivazione ancora sconosciuta. L'attivazione delle PLC determina la formazione, come detto prima, di DAG e IP $_3$. Il **DAG** è idrofobico e resta nel foglietto fosfolipidico e attiva elettivamente **PKC**, da cui l'attivazione metabolica. L'**IP $_3$** è, invece, idrofilico e tende a diffondere nella cellula e si lega a specifici recettori su strutture vescicolari associate al RER che determinano rilascio di **Ca $^{2+}$** nella cellula.

DAG e IP $_3$ sono, in genere, rapidamente eliminate mediante lipasi specifiche o inattivati mediante chinasi.

Sistema delle **MAP** o ERK

Questi enzimi intracellulari MAP (mitogen activated protein-kinases) o ERK (extra-cellular regulated kinases) sono chinasi in genere attivati mediante attivazione di recettori per fattori di crescita. Recentemente è stato dimostrato che i complessi $\beta\gamma$ attivati possono indurre attivazione della cascata delle MAP che traslocano nel nucleo delle cellule attivando specifici fattori di trascrizione.

REGOLAZIONE DELL'OMEOSTASI DEL CALCIO INTRACELLULARE

Fumagalli – capitolo 8

Il Ca $^{2+}$ ione libero contribuisce al potenziale di membrana da un lato e dall'altro ad una serie di funzioni cellulari dipendenti dalla concentrazione del Ca nel citosol, indicata come [Ca $^{2+}$] $_i$.

Il calcio totale in tutte le cellule a riposo varia da **0,5** a **5 mmol/l**, paragonabile a quello extracellulare, che è in media **2 mmol/l**. Nel citosol, il calcio libero è, però, appena **100 nM**, dato che il **99,99 %** è legato a molecole citoplasmatiche o segregato all'interno di granuli.

Il ruolo della membrana plasmatica: canali, pompe e trasportatori

Canali

Il potenziale elettrochimico del Ca è il più elevato tra tutti i vari ioni, sia per la differenza di concentrazione, sia per il potenziale negativo della faccia interna della membrana citoplasmatica. È ovvio che, appena vi sia la possibilità, il calcio tende a entrare nella cellula molto velocemente.

Esistono diversi tipi di canale per il calcio:

- **VO**: voltage operated; canali al calcio voltaggio-dipendenti. Si aprono, permettendo l'ingresso dello ione quando sono depolarizzati.
- **RO**: receptor operated; l'apertura del canale ionico è attivata dall'interazione dell'agonista al sito di legame presente. I vari recettori-canale possono avere permeabilità diverse. Sono d'esempio del recettore **NMDA** per gli a.a. eccitatori, permeabile a Ca $^{2+}$, oppure l'**AchR nicotino**, permeabile al Na $^+$, così come altri AchR permeabili al Ca $^{2+}$.
- **SMO**: second messenger operated; la loro attività dipende dal secondo messaggero **IP $_3$** , prodotto dalla PLC. Questi determina apertura del canale come parte di una cascata metabolica già attiva; sono espressi soprattutto da cellule nervose e neuroendocrine.
- **SD**: store dependant; la loro attività dipende dalla liberazione di un messaggero retrogrado che si origina dai depositi intracellulari a rapido scambio che si sono svuotati. È tipico delle cascate metaboliche a seguito della formazione di **IP $_3$** , che raggiunge il reticolo endoplasmatico

determinando liberazione di Ca^{2+} , così come il Ca^{2+} stesso; se questo finisce si ha liberazione di un messaggero retrogrado che stimola l'apertura del canale.

Pompe e trasportatori

L'attività di pompe e trasportatori è fondamentale per l'omeostasi del calcio, provocando l'estrusione dello ione attraverso la membrana plasmatica e consentono il mantenimento o il ripristino dei bassi livelli di Ca^{2+} presenti nelle cellule a riposo.

La **pompa al Ca^{2+}** espelle uno ione con il consumo di una molecola di ATP. L'attività della pompa è modulata dalla **calmodulina** che si lega al sito regolatorio ed aumenta la V_{max} della pompa.

Se l'aumento di Ca^{2+} è eccessivo, si ha l'attivazione dello **scambiatore $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$** , o **antiporto**, con una affinità minore rispetto alla pompa al Calcio, ma con una capacità di trasporto maggiore. Questo antiporto scambia uno ione calcio con tre ioni sodio.

La sua attività dipende dal **gradiente di Na^{+}** generato dalla **pompa $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPasi**, e da tutti gli altri sistemi scambiatori di sodio. Le depolarizzazioni modeste possono accompagnarsi ad aumenti della concentrazione intracellulare del Na^{+} , diminuendo il gradiente elettrochimico per Na^{+} , riducendone la forza di trazione per il calcio. Modificazioni dello scambiatore del sodio interferiscono, quindi, con il tempo necessario per riportare a livello basale un aumento del calcio.

Su questo principio si basa il meccanismo d'azione di farmaci importanti come i **glicosidi cardioattivi** ed il loro effetto **inotropo positivo**. La loro azione è l'inibizione della pompa $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ATPasi, determinando un accumulo di Na^{+} intracellulare ed una diminuzione del gradiente intra-extracitoplasmatico. Ciò determina una diminuzione dell'estrusione di calcio che si accumula nel reticolo sarcoplasmico.

Pools di Ca^{2+} a cinetica diversa

L'attività della superficie cellulare è accoppiata a quella degli organuli intracellulari, ad esclusione degli eritrociti che non ne ha. Porzioni del **RER** fungono da deposito intracellulare a **rapido scambio di ioni calcio**; si fa riferimento, ovviamente, anche al reticolo sarcoplasmatico delle cellule muscolari striate.

Il sistema è composto da proteine luminali leganti il calcio, canali ionici e pompe.

Pompe e canali sono molecolarmente e funzionalmente diversi da quelli della membrana plasmatica.

Proteine luminali leganti il calcio

Queste proteine appartengono a diverse famiglie, tra cui la più famosa è quella delle **calsequestrine** espresse nelle fibre muscolari. Queste legano anche 50 ioni di Ca^{2+} alla volta, diminuendo la concentrazione dello ione libero ed i suoi effetti negativi, soprattutto impedendone la precipitazione. La **bassa affinità** che le caratterizza permette l'immediata liberazione dello ione quando si aprono i canali.

Canali ionici

Questi consentono la comunicazione diretta del lume del RER con il citoplasma. Ne esistono due classi:

- **Canale del Ca^{2+} sensibile alla rianodina**: la rianodina è un alcaloide vegetale usato per sperimentazione; questo è un omotetramero ed è tipico dei tubuli T dei sarcoplasmici muscolari. La depolarizzazione del tubuli determina apertura del canale (è un canale VO di tipo L). Nel cuore questo canale è attivato anche dal calcio stesso, ed è definito **CICR**: calcium-induced calcium-release; sperimentalmente la rianodina ne impedisce la chiusura.
- **Canale del Ca^{2+} sensibile a IP3**: è un tetramero le cui subunità presentano tutte una grossa porzione citoplasmatica, con un sito di legame per IP3 e due per ATP. L'IP3 funziona da attivatore e l'ATP ed il Ca^{2+} funzionano da modulatori allosterici. Questa doppia modulazione permette inizialmente di espellere il calcio quando è poco e di bloccare l'uscita quando è

troppo. Questo complesso di regolazione è probabilmente alla base delle **oscillazioni delle correnti di Ca²⁺ intracellulari** (vedi alla fine del capitolo).

È importante sottolineare come l'aumento di Ca²⁺ intracellulare indotta da IP₃ si traduca, attraverso i CIRC, nell'attivazione dei canali sensibili alla rianodina e, quindi, in un potenziamento dell'attività di rilascio del Ca²⁺ dai depositi a rapido scambio.

Pompe al Ca²⁺

Le pompe al Ca²⁺ sono **ATPasi** diverse da quelle della membrana cellulare, definite **SERCA**: Sarcoplasmic-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ATPase. Queste trasportano 2 ioni Ca²⁺ nel reticolo con l'idrolisi di una molecola di ATP. Sono prodotte da geni diversi e sono sensibili alla *tapsigargina ed al ciclopiazonato*.

Altri organuli

Anche altri organuli hanno grosse riserve di Ca²⁺, probabilmente per la loro funzione. Questi organuli sono:

- Nucleo.
- Golgi.
- Granuli cromaffini.
- Granuli di zimogeno pancreatici.
- Vescicole sinaptiche.
- Endosomi e lisosomi

Ogni organulo dispone di un pool di calcio per le proprie attività. Diversamente avviene nel **mitocondrio**, che, per le sue caratteristiche, funge da **serbatoio d'emergenza**. L'altissimo potenziale di membrana negativo di circa **200 mV**, a cavallo della membrana interna, deve essere mantenuto per tutti i processi di fosforolazione ossidativa, che, come sappiamo, sono la base della vita cellulare. Questo potenziale è un'ottima forza di trazione per il Ca²⁺, ma il trasportatore mitocondriale ha un'affinità molto più bassa dei trasportatori SERCA. Solo quando la concentrazione di calcio raggiunge picchi di **5 μM** o più, questo trasportatore si attiva immagazzinando il calcio nel mitocondrio. A lungo andare, però, troppo calcio può precipitare, ma, ancor più, positivizzare il potenziale di membrana bloccando i processi di respirazione cellulare.

Cosa succede in una cellula?

Il Calcio ha, quindi, una sua omeostasi che consta delle seguenti tappe:

- **Influsso e rilascio**: l'influsso avviene tramite canali ionici RO, SMO, VO e SD; il rilascio avviene dagli organuli intracellulari a rapido scambio sensibili a IP₃ o al Ca²⁺ stesso (rianodina-sensibili).
- **Estrusione**: grazie ad attività di pompe poste sulla membrana plasmatica, la cui attività è modulata dalla concentrazione del Ca²⁺ stessa e dalla composizione elettrolitica intracellulare.
- **Sequestro**: avviene negli organuli intracellulari ad opera di ATPasi specifiche della famiglia SERCA.

Proteine citosoliche leganti il calcio

Le proteine citosoliche leganti il calcio hanno tutte un dominio comune, definito **EF-hand**; questo ha funzione di legare il calcio in modo selettivo e con alta affinità.

Le principali sono:

- **Calmodulina**: lega 4 ioni Ca²⁺. Si lega a numerosi enzimi ed è un regolatore allosterico.
- **Troponina**: presente nel muscolo, è fondamentale per la contrazione.
- **Calpaina**: è una proteasi intracellulare attivata dal Ca²⁺.

- **Annessine:** legano il calcio e fosfolipidi come la fosfatidilserina. L'annessina I è fondamentale nei processi infiammatori, inibendo la **fosfolipasi A2**. Alcuni steroidi agiscono promuovendo la produzione di annessina I in monociti e linfociti.

Il calcio è variabile

La concentrazione del calcio è variabile. Nell'acqua la diffusione del Calcio è molto veloce, ma nel citosol è di gran lunga più lenta. Ciò spiega la necessità della presenza di depositi a scambio rapido. La presenza, inoltre, di zone con una concentrazione maggiore di Ca^{2+} rispetto ad altre, inoltre, spiega l'attività di alcune cellule, come i neuroni, ove una depolarizzazione determina modificazioni in una zona, come in un dendrite, e non nel soma.

Sono presenti, inoltre, **correnti di calcio**. Come detto in precedenza, la presenza di **canali sensibili a IP3** e la loro attività con una "accensione" ed uno "spegnimento" legata alle concentrazioni di ATP e Ca^{2+} , è alla base del fenomeno dell'**oscillazione**.

Una stimolazione massimale di dei recettori di superficie determina attivazione completa dei canali con un **spike**. Stimolazioni molto più basse, simili alle condizioni fisiologiche, determinano attivazione di una **zona superspecializzata** del RER particolarmente sensibile a IP3 che si comporta da pacemaker e determina liberazione del calcio. Quando si ritorna allo stato di riposo ed il calcio è alle concentrazioni di riposo, ricomincia il ciclo.

Questo meccanismo è fondamentale per la formazione di correnti continue all'interno della cellula affinché processi metabolici non si arrestino.

Il Calcio nella patologia cellulare

Troppo calcio può essere dannoso per tre motivi principali:

- **Attivazione proteasi Ca^{2+} -dipendenti:** le calpaine sono inattivate mediante legame alle calpastatine. Un aumento del calcio determina dissociazione del complesso calpaina-calpastatina, con rottura dei siti di legame delle calpastatine ed attivazione continua delle calpaine.
- **Alterazione del mitocondrio:** troppo calcio può determinare positizzazione del potenziale della membrana interna, arresto della respirazione e precipitazione del calcio con rottura del mitocondrio. Si ha liberazione del **citocromo P450** che attiva le **caspasi**, enzimi iniziali del processo di apoptosi.
- **Attivazione delle fosfolipasi A2:** fondamentali nell'eliminazione degli idroperossidi, sono calcio e calmodulina-dipendenti. se attivate troppo possono avere azione citotossica.

I RECETTORI PER I FATTORI DI CRESCITA

Fumagalli – capitolo 9

I **fattori di crescita** sono numerosi polipeptidi che, liberati nell'ambiente extra-cellulare, sono capaci di stimolare la proliferazione. Sono divisi in **fattori di competenza**, e reclutano le cellule quiescenti nel ciclo cellulare, e in **fattori di progressione**, indispensabili per la transizione dalla fase G_1 alla fase S.

L'attività biologica è mediata da recettori proteici ad elevata affinità localizzati nella membrana plasmatica. La maggior parte di essi ha attività enzimatica **tirosin-chinasica**, inibita a riposo; il legame del fattore di crescita con il recettore determina la rimozione dell'inibizione. Le risposte, inoltre, possono essere immediate e transitorie o ritardate e durevoli; le fasi precoci di queste risposte vengono definite con il termine di **traduzione del segnale**.

Con alcune eccezioni i fattori di crescita, i loro recettori ed i trasduttori del segnale sono i prodotti dei cosiddetti **protooncogeni**; risulta ovvio, quindi, che alterazioni di questi geni sono fondamentali nello sviluppo di alterazioni metaboliche, come, ad esempio il **diabete insulino-resistente**, per alterazione del recettore dell'insulina, o per la formazione di un tumore, per la **attivazione costitutiva** di un recettore per qualche fattore di crescita.

Organizzazione molecolare dei recettori per i fattori di crescita

Ad eccezione del recettore per l'insulina, che è tetramerico, e dell'HGF, che è dimerico, tutti i recettori per i fattori di crescita sono **monomerici**, ed hanno una tipica conformazione, articolati in cinque domini funzionali.

1. **Dominio extracellulare:** porzione N-terminale; comprende il sito di legame ad elevata affinità; è formato da alcune centinaia di amminoacidi e possiede diversi residui di cisteina per il **foldig proteico**.
2. **Dominio transmembrana:** è costituito da circa 25 amminoacidi idrofobici; questo dominio è seguito da una serie di residui basici che fungono da segnale di ancoraggio alla membrana.
3. **Dominio iuxta-membrana:** nella parte citoplasmatica comprende una cinquantina di amminoacidi ed è sede importante di funzioni regolatorie. Questa regione è definita, infatti, **transmodulatoria**, per la presenza di residui di serina, treonina e tiroxina che possono essere fosforilati o defosforilati. Ciò spiega come l'attivazione di una via può modulare altre vie.
4. **Dominio catalitico:** è composto da circa 250 amminoacidi ed è caratterizzato anche dalla presenza di subunità regolatorie; questa parte è molto conservata nelle diverse sottofamiglie, fino al 90%.
5. **Coda C-terminale:** contiene circa 250 amminoacidi.

A seconda delle caratteristiche di questi domini esistono circa 15 famiglie di recettori.

Attivazione e traduzione del segnale dei recettori per i fattori di crescita

Il legame del fattore di crescita al suo recettore determina un processo di **dimerizzazione**: si completa il meccanismo di legame tra due recettori che avviene normalmente sulla membrana. La peculiarità del legame del recettore al proprio ligando è il cambiamento conformazionale che questi subisce; in modo tale i due recettori che si legano tra loro nel processo della dimerizzazione, presentano dei siti catalitici disponibili per effettuare delle **transfosforilazioni**. Una volta che il recettore sia stato fosforilato, può **autofosforilarsi**. Questo processo di trans/autofosforilazione è fondamentale per l'attivazione di altri siti catalitici che attivano gli altri processi di traduzione del segnale a valle.

I **trasduttori intracitoplasmatici** sono tutti caratterizzati dalla presenza di tre domini specifici, definiti **SH2**, **SH3** e **PTB**, (SH significa SRC homology region e PTB è l'acronimo di Phospho-Tyrosine Binding). Questi sono importanti perché riconoscono i recettori con residui di tirosina fosforilati e solo ad essi possono legarsi; SH2 e SH3 hanno funzione di attivazione del trasduttore, mentre PTB ha funzione di regolazione.

Esistono due classi di trasduttori provvisti di dominio SH2 e SH3. La prima definisce proteine ad attività enzimatica come PLC, la tirosin-chinasi codificata dal gene src, definita **pp60^{src}**, le fosfotirosine-fosfatasi **SH-PTP1** e **SH-PTP2**, l'attivatore delle GTPasi **GAP** e gli attivatori della trascrizione **STAT**. La seconda classe raggruppa trasduttori privi di attività enzimatica intrinseca, quali le molecole **Grb2**, **Shc** e **p85**, e la subunità non catalitica della **PI3-K**.

La via di traduzione mediata da ras

La proteina **Ras** è di 21kDa; è ubiquitariamente espressa e si associa alla membrana plasmatica attraverso l'aggiunta di un gruppo **farnesilico** alla sua estremità C-terminale. Ras-GDP è inattiva e Ras-GTP è attiva. A seguito del legame recettore-ligando, **Ras-GTP** aumenta; esistono due trasduttori intracitoplasmatici specifici per Ras: il primo si chiama **SoS** ed è un GNRF (Guanosine Nucleotide Releasing Factor), che aumenta il passaggio a Ras-GTP; il secondo si chiama **GAP**, ed è un **Proteina Attivante le GTPasi**, che aumenta il ritorno a Ras-GDP.¹

Attivata Ras esistono diverse vie di traduzione, delle quali due sono le più studiate:

¹ La mancanza del gene **NF1** che codifica una GAP detta **neurofibromina** è responsabile di una sindrome tumorale nota come la **Neurofibromatosi di Recklinghausen**.

1. **mediata da Raf:** Ras → Raf → MEK → ERK/MPK → espressione di **c-FOS**: passaggio da G₁ a S.
2. **mediata da MEK-1:** Ras → MEK-1 → SAPK/JNK → attivazione del fattore trascrizionale codificato dal proto-oncogene **Jun**.

Segnali fosfolipidici

La maggior parte delle tirosin-chinasi recettoriali attivate stimola enzimi che generali secondi messaggeri lipidici, come la **PLC** e le **PI3-K**: i risultati di queste attivazioni sono la formazione di PI, PIP-3, DAG e aumento del Ca²⁺ intracellulare. Di grande importanza sono i bersagli delle **PI3-K**, che sono coinvolti nel controllo della sopravvivenza cellulare, del movimento e della proliferazione.

Tirosin-chinasi non recettoriali, fosfatasi e STAT

Il prodotto del proto-oncogene **src**, **pp60^{src}**, è il capostipite di una famiglia di tirosin-chinasi citoplasmatiche comprendente almeno dieci membri altamente omologhi.

Queste chinasi, seguite dalle **fosfatasi**, tra le quali le più importanti e meglio studiate sono **SH-PTP1** e **SH-PTP2**, così come i **fattori attivanti la trascrizione**, meglio conosciuti come **STAT**, sono altri trasduttori di segnale citoplasmatici fondamentali per la cellula.

Approcci farmacologici

Da tempo si studia la possibilità di usare farmaci per inibire il segnale dei fattori di crescita per terapie **antineoplastiche**. A questo scopo si è tentato di usare **anticorpi monoclonali** contro gli epitopi extracellulati di recettori tirosin-chinasici come, ad esempio, quelli dell'EGF; questi tentativi sono ottimi, ad esempio, per la stadiazione tumorale.

Le maggiori speranze sono offerte da un gruppo di farmaci **inibitori dell'attività catalitica tirosin-chinasica**. Ad eccezione del capostipite **quercetina**, che è risultata tossica perché attiva su gran parte degli enzimi che hanno come substrato l'ATP, i principali composti studiati sono il suo derivato **erbstatina** ed i derivati **benzenemalononitriti**, così come la **lavendustina A**, anch'essa derivata dalla quercetina. Questi composti sono definiti **tirfostine**.

Un altro principale approccio farmacologico è legato all'inibizione della **farnesilazione** di Ras; questa avviene in una regione definita **CaaX box**, grazie all'unico donatore **FPP** (farnesil-fosfato). Gli inibitori sono divisi in tre classi: quelli che competono con FPP, quelli che competono con CaaX box e quelli che competono con entrambi.

MODULAZIONE DELLE RISPOSTE RECETTORIALI

Fumagalli – capitolo 12

I recettori per i ligandi endogeni sono lo strumento per cui la cellula risponde agli stimoli esterni, ed è per questo che sia i recettori che i relativi sistemi di trasduzione sono continuamente soggetti ad un fine controllo sia qualitativo che quantitativo. Alterazioni di questi controlli possono comportare scompensi o patologie; è il caso della **miastenia grave**, legata a riduzione del numero di recettori per l'ACh, oppure alcune forme di **diabete insulino-resistente**, per riduzione del numero di recettori per l'ormone.

Stati patologici possono portare, in maniera secondaria, ad una alterazione di questi meccanismi; è il caso dell'**insufficienza cardiaca** o l'**infarto** che inducono, in un tempo l'aumento del numero dei recettori, mentre in un secondo momento ne determinano una riduzione della capacità dei recettori stessi di trasdurre correttamente il segnale.

In caso di **denervazione**, ed in tutti i casi di assenza di segnale, la cellula risponde con un aumento del numero di recettori superficiali, per "sentire" meglio il segnale.

I fenomeni di adattamento delle risposte recettoriali vanno sotto il nome di **tolleranza**, che, in caso di terapia esogena, determina **scomparsa** dell'efficacia del trattamento farmacologico. Ciò significa

che, una volta che la cellula si sia adattata alla quantità di farmaco somministrato, è necessario **aumentare** le dosi. In genere la tolleranza si instaura per trattamenti prolungati, ed è reversibile con la sospensione della terapia; se si instaura troppo rapidamente, si parla di **tachifilassi**.

Direttamente collegato a questo è l'**effetto rimbalzo** che si verifica in caso di sospensione di una terapia farmacologica. È il caso del trattamento con **broncodilatatori** che agiscono come **β_2 -agonisti** sulla muscolatura bronchiale per determinare broncodilatazione. In caso di arresto della terapia, la quantità di catecolamine endogene non sarà sufficiente a stimolare il rilassamento della cellula muscolare liscia bronchiale e il paziente può andare in contro a broncocostrizione.

Tutti i meccanismi di modulazione sono **bidirezionali**: il trattamento con farmaci agonisti può comportare diminuzione delle risposte recettoriali; viceversa, il trattamento con farmaci antagonisti può determinare un aumento delle risposte. La riduzione delle risposte recettoriali è definita **desensitizzazione**; questa vale solo per i recettori per mediatori endogeni, escludendo, quindi, i canali ionici, gli enzimi, le pompe ed i trasportatori.

Desensitizzazione

Il termine desensitizzazione si riferisce al processo in base al quale l'esposizione persistente ad un agonista porta ad una riduzione dell'effetto stimolatorio. Questa può essere **omologa**, se la perdita dell'attività dell'agonista è specifica per il recettore di superficie che è attivato, ed **eterologa**, nel caso in cui la perdita dell'attività è legata alla stimolazione persistente di altre vie.

La desensitizzazione può avvenire in diversi modi:

- Riduzione dell'affinità.
- Incapacità di trasdurre il messaggio.
- Riduzione del numero delle molecole recettoriali: in questo caso si parla di **down-regulation**, divisa in breve e prolungata (vedi dopo).

Desensitizzazione dei recettori-canale

Il recettore più studiato è quello **nicotinico per l'Acetilcolina**. Questi è presente in 3 stadi differenti, interconvertibili:

- **Riposo**, non legato al ligando, in cui il canale è chiuso.
- **Attivato**, legato al ligando, in cui il canale è aperto.
- **Desensitizzato**, legato al ligando, in cui il canale è chiuso.

Effettuato il legame con l'Acetilcolina, il recettore aumenta l'affinità per il neurotrasmettitore e passa allo stadio desensitizzato. La desensitizzazione è una proprietà intrinseca della molecola recettoriale che non richiede modificazioni post-traduzionali ed è completamente e rapidamente reversibile. In alcuni **recettori nicotinici neuronali**, la sensibilità alla desensitizzazione è così marcata e durevole che l'esposizione cronica all'agonista nicotina porta a depressione persistente della trasmissione sinaptica.²

La velocità con cui l'equilibrio si sposta verso lo stato desensitizzato dipende dalla fosforilazione del recettore, che avviene da parte di **PKA** e **PKC**, dal potenziale transmembranario e dall'occupazione di siti allosterici; la stessa acetilcolina ha la capacità di legarsi a questi siti allosterici, determinando desensitizzazione, meccanicamente, questo, che prende il nome di **inibizione isosterica**, voltaggio dipendente. L'iperpolarizzazione, infine, accelera la desensitizzazione, mentre la depolarizzazione ha l'effetto opposto.

I **curari depolarizzanti** come la **succinilcolina**, sono agonisti del recettore per l'acetilcolina e sono relativamente resistenti all'azione della **colinesterasi**: sono usati come farmaci paralizzanti, così come determinato dagli **anticolinesterasici**.

Desensitizzazione dei recettori accoppiati a G-proteins

² La prolungata inibizione da desensitizzazione di questi recettori è a sua volta responsabile del fenomeno paradosso della **up-regulation** indotta da nicotina.

Il modello di recettore è quello **β -adrenergico**, associato alla modulazione dei livelli intracellulari di cAMP.

La desensitizzazione è legata a:

- **Perdita dell'affinità per l'agonista:** è legata ad una serie di tappe importanti. Questa è legata ad una serie di chinasi e, specificamente per il recettore β -adrenergico, è la **β ARK** (beta-adrenergic receptor kinase). Questa determina fosforilazione dei recettori β solo quando legati alla catecolamina. La fosforilazione avviene su serina e treonina. Il recettore così fosforilato perde di affinità per il proprio ligando.
- **Riduzione di attivazione delle G-protein:** il recettore fosforilato che ha perso affinità subisce, inoltre, un legame ad una proteina definita **β -Arrestina** che impedisce, stericamente, ulteriori interazioni recettore-proteina G.
- **Riduzione del numero:** il complesso ligando-recettore fosforilato- β -arrestina ha, ora, la possibilità di essere rimosso dalla membrana plasmatica, mediante un processo di endocitosi mediata da **clatrina**. Questa fase è importante perché così il complesso può raggiungere i suoi bersagli intracitoplasmatici quali **c-Src**, per poi attivare la cascata delle **MAP**. In questa fase si verifica la **down regulation rapida**, per la momentanea diminuzione del numero di recettori: il complesso nell'endosoma può essere scisso ed il recettore recuperato; se la stimolazione dell'agonista è molto lunga, il complesso nell'endosoma è degradato in maniera definitiva, in modo da ottenere una **down-regulation tardiva**. Nel caso del recettore β -adrenergico, la down-regulation è legata anche a riduzione dell'espressione di mRNA; nel caso del recettore α -adrenergico, la down-regulation si basa sull'accelerata degradazione del complesso.

La desensitizzazione può accompagnarsi a modulazione crociata dell'attività di proteine G ad attività diversa ma funzionalmente accoppiate allo stesso effettore.

Differenza nella regolazione dei recettori accoppiati ad attivazione della PLC

La desensitizzazione dei recettori accoppiati all'attivazione della PLC presenta due caratteristiche principali: la desensitizzazione è solamente **omologa** ed, inoltre, è presente un feed-back negativo di controllo dell'attività GTP-asi della proteina G effettuato dalla PLC stessa.

La desensitizzazione dei recettori intracellulari

Anche i recettori intracellulari vanno incontro a down-regulation. La riduzione del numero dei recettori è strettamente dipendente dal controllo dell'espressione dell'mRNA codificante; in particolare la prima fase della down-regulation è legata a diminuzione della trascrizione, mentre la seconda fase è legata ad aumento della degradazione dell'mRNA.

Tolleranza agli oppioidi

Al contrario di quanto detto, la somministrazione continua di agonisti dei recettori per gli oppioidi, situati nelle importanti stazioni catecolaminergiche come il **locus coeruleus**, non provoca alterazioni della affinità e del numero dei recettori nel SNC. Questi recettori, negativamente accoppiati all'adenilato ciclasi tramite una G_i (inibizione), subiscono un parziale disaccoppiamento. Quest'ultimo, insieme all'aumento del cAMP, è responsabile della tolleranza ai farmaci ed all'**ipereccitabilità** dei neuroni durante le crisi di astinenza.

Ha implicazioni terapeutiche il fatto che siano presenti, in questi nuclei, recettori **α_2 -adrenergici** negativamente accoppiati all'adenilato ciclasi; ciò permette la somministrazione del loro agonista **clonidina** durante le crisi di astinenza (per diminuire cAMP).

Up-regulation

L'unico meccanismo noto di up-regulation, oltre all'inibizione di tutti i meccanismi di desensitizzazione, è l'**aumento del numero totale recettori**.

Questo meccanismo è, normalmente, tipico solo delle cellule nervose e nel tessuto muscolare, ed, in genere, solo dopo **denervazione**.

Il recettore nicotinico muscolare, dopo denervazione, compare in numero abnorme in tutte le parti della cellula fuori dalla giunzione muscolare.³

Questa up-regulation è legata alla perdita dell'inibizione di **fattori miogenetici** normalmente inibiti, mediante fosforilazione, da PKC e/o da chinasi Ca²⁺-calmodulina dipendenti; in sintesi, la carenza di Ca²⁺ per l'assenza della contrazione muscolare.

Tutti i recettori che subiscono **up-regulation** sono caratterizzati da un diverso contenuto in **subunità** recettoriali.

I CANALI IONICI

(ed equilibrio elettrico alla membrana)

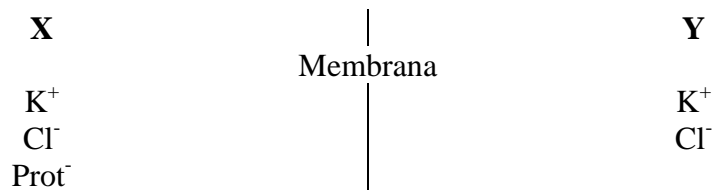
Fumagalli – capitolo 15

Cosa sono e a cosa servono

I canali ionici costituiscono una classe di proteine responsabile della generazione e della regolazione dei segnali elettrici presenti nel cervello, nel cuore e nel muscolo; sono, inoltre, **bersaglio d'azione** di molti composti terapeutici; moltissime **patologie** derivano da difetti genetici di queste proteine. Questi canali sono classificati in base all'ione permeante, quindi in base alla loro selettività, ed in base al loro meccanismo d'azione.

La presenza degli ioni in una cellula, ed al di fuori di essa, è importante per la formazione di uno **stato di equilibrio**. Ciò deriva, essenzialmente, dal fatto che all'interno ed all'esterno di una cellula sono presenti **ioni non diffusibili**.

Ciò vuol dire che se è presente, all'interno di una membrana, ioni non diffusibili, la distribuzione degli altri ioni diffusibili è influenzata. Consideriamo il sistema **X-Y**:



Assumendo che la membrana sia impermeabile a Prot⁻ e permeabile a K⁺ e Cl⁻, ed assumendo che questi siano, inizialmente, in concentrazioni uguali, avremo che Cl⁻ tende a diffondere lungo il suo gradiente di concentrazione (X → Y), e K⁺ si sposta lungo il suo gradiente elettrico (X → Y), in modo tale da mantenere la neutralità elettrica del lato Y. Ad equilibrio raggiunto, si avrà:

$$[K^+]_x > [K^+]_y$$

ed inoltre, dal lato X le particelle osoticamente attive sono in numero maggiore dal lato X che dal lato Y. In presenza di un **ione non diffusibile**, quelli diffusibili si distribuiscono in modo che i loro rapporti di concentrazione siano uguali all'equilibrio.⁴

$$[K^+]_x / [K^+]_y = [Cl^-]_x / [Cl^-]_y$$

da cui deriva:

$$[K^+]_x [Cl^-]_x = [K^+]_y [Cl^-]_y$$

Questa è l'equazione di **Donnan-Gibbs** che vale per ogni coppia di cationi ed anioni che hanno la stessa valenza. L'effetto Donnan ha conseguenze fondamentali nel corpo:

- Per la presenza di Prot⁻ all'interno della cellula, questa risulta possedere un maggior numero di particelle osmoticamente attive; per evitare fenomeni di osmosi che comporterebbero rigonfiamento e lisi della cellula, è **necessaria la presenza della pompa Na⁺/K⁺-ATPasi**.
- Per la distribuzione asimmetrica di ioni diffusibili attraverso la membrana, fra i due lati della stessa è **presente un gradiente elettrico**, definito **potenziale di riposo V_{REST}**, **negativo** all'interno della membrana e **positivo** all'esterno.

³ Questo meccanismo è alla base dell'**ipersensibilità da denervazione** agli agenti **colinomimetici**.

⁴ Legge di **Donnan e Gibbs**.

- Per il maggior numero di proteine nel plasma rispetto al liquido interstiziale, è presente un effetto Donnan sul movimento di ioni attraverso la parete capillare.

È chiaro, quindi, che, lungo la membrana, esiste un **gradiente di concentrazione** ed un **gradiente elettrico** per ogni ione diffusibile, che determinano un flusso di ioni fino all'instaurazione di un equilibrio. Il **potenziale di Nerst** (E_{ione}), o **potenziale d'inversione**, è il potenziale di membrana alla quale si stabilisce questo equilibrio; questo varia da ione a ione. I potenziali di Nerst per gli ioni più comuni sono:

- Na^+ : + 70 mV.
- K^+ : - 95 mV.
- Cl^- : - 30/-60 mV.
- Ca^{2+} : +150 mV.

Poiché le cellule hanno un abbondanza di canali selettivi per lo ione K^+ , il **potenziale di riposo** (V_{REST}) di una cellula tende all' E_K , risultando sempre negativo, fra **- 40 e - 90 mV**.

Secondo i potenziali di Nerst, se non esistessero meccanismi di regolazione, esisterebbero correnti di ioni Na^+ e Ca^{2+} verso **l'interno** della cellula, e correnti di K^+ e Cl^- verso **l'esterno** della cellula.

Le concentrazioni degli ioni Na^+ e K^+ , che sono fondamentali per "reggere il gioco elettrico", sono mantenute costanti grazie alla presenza della famosa **pompa Na^+/K^+ -ATPasi**; questa, mediante l'uso di una molecola di ATP, trasporta **3 Na^+** verso **l'interno** e **2 K^+** verso **l'esterno**.

- Secondo i gradienti elettrico e di concentrazione: Na^+ dentro e K^+ fuori.
- **Grazie ad Na^+/K^+ -ATPasi**: 3 Na^+ fuori e 2 K^+ dentro.⁵

A livello microscopico ogni apertura-chiusura di un canale produce un flusso di decine di milioni di ioni al secondo e rappresenta un modo economico per produrre in breve tempo un cambiamento del potenziale di riposo.

È chiaro, adesso, che le cellule possiedono tutte un V_{REST} , normalmente negativo intorno ai **-60 mV** o più negativo. Per definizione di **eccitamento**, $V_M > V_{REST}$ determinano **eccitazione**, mentre $V_M < V_{REST}$ determinano **inibizione**. In base al loro potenziale di Nerst, ne consegue che i canali ionici selettivi per Na^+ e Ca^{2+} , normalmente chiusi a riposo, sono aperti a livelli depolarizzati, causando ingresso di cationi (ioni positivi), producendo depolarizzazioni. Ciò implica che il canale ionico si deve **aprire** per determinare una risposta fisiologica.

Non solo V_M è in grado di governare la cinetica di un canale ionico, ma anche altre variabili: $[Ca^{2+}]_i$, $[cAMP]_i$, $[ATP/ADP]_i$, secondi messaggeri come IP_3 e DAG, proteine G, legami con proteine del citoscheletro, neurotrasmettitori ed ormoni.

Struttura di un canale ionico

La componente principale di un canale ionico è rappresentata da una struttura proteica il cui peso molecolare si aggira sui **200-250 kDa**. Nel caso del canale al Na^+ , questa consiste di una singola grossa catena polipeptidica, subunità α , organizzata in forma simile ad un tetramero, mentre nel caso dei canali a K^+ quattro distinti polipeptidi più piccoli si associano per ottenere un tetramero con lo stesso ruolo funzionale.

Ogni **subunità** è formata da diversi **domini**: questi domini presentano grosse omologie tra i diversi tipi di canali (al Na^+ , al K^+ ed al Ca^{2+}). Ciascun dominio presenta **6 segmenti** formati prevalentemente da aminoacidi idrofobici (da S1 a S6) e sono, presumibilmente, **transmembranari**. I segmenti **S5** ed **S6** sono quelli situati più al centro, mentre gli altri sono più radiali. Oltre a queste subunità principali, esiste un insieme di subunità accessorie variabili nei diversi canali, sia come numero, che come tipo, e che contribuiscono ad un corretto assemblaggio, trasporto, localizzazione alla membrana e funzione del canale stesso.

⁵ Nella **sferocitosi ereditaria**, anemia di IV gruppo, da ridotta emivita eritrocitaria, si ha un difetto di membrana con alterazione del trasporto cationico. Ciò determina un aumento della permeabilità a Na^+ e K^+ , che tendono a seguire i potenziali di Nerst: Na^+ entra e K^+ esce. Tutto ciò determina una alterazione della membrana per rigonfiamento osmotico della cellula ed una iperattività della Na^+/K^+ -ATPasi, che cerca di compensa, con una conseguente deplezione di ATP: lo sferocita può andare incontro a lisi.

- **Voltaggio-dipendenza:** il segmento transmembranario **S4** di ciascun dominio presenta caratteristiche peculiari assenti nei canali non voltaggio-dipendenti. Sono presenti, infatti, residui aminoacidici carichi positivamente, come l'arginina, ripetuti a intervalli regolari: ciò permette un cambiamento conformazionale del canale, e quindi, l'apertura, in base a V_M .
- **Selettività:** il tratto che congiunge i segmenti transmembranari **S5** ed **S6** contiene una sequenza di circa 20 aminoacidi, chiamata **sequenza P**, che determina la selettività del canale. Questo segmento forma un vero e proprio **anello** che forma il contorno del poro del canale, formando il **filtro di selettività**.
- **Inattivazione:** una sequenza di 20 aminoacidi nel tratto intracellulare tra i segmenti **S3** ed **S4** risulta essere in grado di legare farmaci (anticorpi), capaci di bloccare l'inattivazione del canale: **cancello di inattivazione**. Questa zona costituirebbe il cancello che andrebbe ad ostruire il poro del canale durante il processo di inattivazione.
- **Indirizzo:** i canali sono indirizzati da proteine particolari a localizzarsi dove ce n'è bisogno. Alcune proteine plasmatiche di recente scoperta, come **PSD-95**, sono in grado di legare domini definiti **PDZ**, che a loro volta legano le code citoplasmatiche C-terminali di proteine canali. Altri domini PDZ legano, inoltre, enzimi come la **ossido nitrico sintetasi**, formando un macrocomplesso funzionale localizzato.⁶

Per ogni canale esistono, inoltre, **numerose isoforme**, legate, probabilmente, a splicing alternativo.

La struttura tetramerica con quattro domini omologhi, ognuno contenente 6 segmenti transmembranari sopra descritta, è molto conservata nei diversi tipi di canali ionici voltaggio-dipendenti, suggerendo un collegamento filogenetico. Le subunità monomeriche dei canali al K^+ suggerisce che questi siano i precursori dei canali tetramerici. È stato recentemente dimostrato, però, che strutture molto più piccole, composte da soli due segmenti transmembrana, danno origine a canali al K^+ non voltaggio-dipendenti; in essi, infatti, manca il **segmento S4** della voltaggio-dipendenza.

I canali per gli anioni, come il canale al Cl^- voltaggio-dipendente, è formato, probabilmente, in un modo completamente diverso: 12 segmenti idrofobici transmembranari.

Come agiscono i farmaci?

Molte classi di farmaci esplicano la propria attività terapeutica in seguito ad interazione diretta con i canali ionici, come ad esempio gli anestetici locali, gli antipertensivi e gli antianginosi, gli antipertensivi ed ipoglicemizzanti orali. Altri farmaci, invece, agiscono con recettori metabotropici 7TMS, avviando processi biochimici per i quali si può ottenere **modulazione** dell'attività di un canale ionico: esempio tipico è la stimolazione della **noradrenalina** del **recettore β -adrenergico** che attiva una G-protein (G_s) che modula i canali L per Ca^{2+} , con aumento dell'inotropismo cardiaco.

Viceversa, l'azione negativa dell'**acetilcolina** sul recettore **muscarinico** determina l'attivazione di G_i provocandone dissociazione e le subunità $\beta\gamma$ si legano al **canale rettificatore al K^+** , determinando l'effetto cronotropo ed inotropo negativo.

Altre sostanze, di origine animale, come tossine, od alcuni oligoelementi, possono determinare blocco dei canali ionici.

I canali al sodio

I canali al sodio voltaggio-dipendenti sono responsabili della fase di **depolarizzazione** dei potenziali d'azione. La permeabilità al Na^+ è bifasica, con un rapidissimo aumento in risposta alla depolarizzazione, ed una riduzione a livelli basali nell'arco di 1 msec nonostante la continua depolarizzazione.

⁶ Questi macrocomplessi sono fondamentali per la disposizione dei canali in tutte le cellule, come ad esempio per i neuroni e la tipica disposizione in corrispondenza dei nodi di Ranvier.

I canali al Na^+ , come quelli al Ca^{2+} , sono composti da una singola catena polipeptidica formata il vero canale ionico, chiamata **subunità α** , corredata da subunità accessorie β , di solito una o due, con il ruolo di modulazione.⁷

Le subunità α sono presenti in diverse isoforme:

- SCN1A, 2A e 3A: nervoso.
- SCN4A e 5A: muscolo scheletrico.
- H1 o hNA_v: cardiaco.

I farmaci che agiscono sui canali al sodio

- **Anestetici locali**: lidocaina, benzocaina, bloccando i canali al Na^+ dei nervi periferici.
- **Antiarritmici di I classe**: chinidina, procainamide, encainide, propafenone, bloccando i canali al Na^+ cardiaci.
- **Anticonvulsivanti I sottoclasse**: fenitoina e carbamazepina, bloccando i canali al Na^+ dei neuroni centrali, utili nelle convulsioni tonico-cloniche e nelle epilessie parziali.

Tutti questi farmaci bloccano il canale al Na^+ **dall'interno**, interagendo con un sito specifico, differente dai siti per le tossine.

Tale sito è localizzato in **S6 del 4 dominio della subunità α** , all'interno del poro ionico e vicino al cancello di inattivazione ed al filtro di selettività.

L'interazione di questi farmaci è **frequenza-dipendente**: il farmaco si lega al canale solo quando è aperto, quindi, maggiore è la frequenza, maggiore sarà il blocco. Il blocco è, inoltre, **voltaggio-dipendente**: legato al voltaggio della cellula, in base alla frequenza di depolarizzazioni ed ai danni subiti da una cellula, che ne modifica il potenziale. Ciò vuol dire che questi farmaci agiscono **selettivamente su cellule non a riposo**, cioè molto attivate. È questa proprietà che determina l'effetto farmacologico solo su cellule cardiache danneggiate (e quindi depolarizzate), e sulle cellule nervose che subiscono numerose scariche elettriche, come nelle epilessie.

Il blocco dei canali per Na^+ determina un risparmio dell'attività della Na^+/K^+ -ATPasi, perché entra meno Na^+ nella cellula e, quindi, ne deve essere espulso di meno; ciò determina un diminuito consumo di ATP, con un miglioramento delle altre funzioni.

Canali al Na^+ non voltaggio-dipendenti

Alcuni tipi di canali al Na^+ sono tipicamente diffusi negli epitelii e massivamente presenti nel rene a livello del **tubulo distale finale e dotto collettore**: questi canali sono definiti **EnaC**. Questi sono fondamentali nel mantenere un voltaggio a cavallo della membrana luminale: ciò determina un aumento dell'escrezione di K^+ , ed un aumento dell'assorbimento di Na^+ . Questi canali non sono voltaggio-dipendenti e sono **eterooligomeri** formati da 3 subunità: α , β e γ , di cui solo α forma il canale.

Il canale è bersaglio di **ADH** e **aldosterone**, per un aumento dell'assorbimento di Na^+ . L'alterazione di questi canali possono determinare iperattività alla base della patologia ipertensiva familiare nota come **sindrome di Liddle**.

Una classe di farmaci, noti come **risparmiatori di K^+** , di cui l'**amiloride** è il capostipite, inducono blocco di questi canali con l'effetto di assorbire meno Na^+ e conservare il K^+ . Questi farmaci vanno somministrati in associazione con altri diuretici.

I canali al calcio

I canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti si dividono in vari sottotipi per caratteristiche cinetiche, funzionali, di modulazione farmacologica e di localizzazione tissutale differenti.

La loro **struttura** è legata alla presenza di una **subunità principale α_1** che forma il poro ionico e possiede tutti i siti extracellulari di legame per gli agonisti finora noti; questa subunità è molto

⁷ La fosforilazione da parte di PKC determina riduzione del flusso ionico; a livello cardiaco sembrano essere modulate direttamente da G_s .

simile alla subunità α dei canali al Na^+ . Fino ad oggi sono stati individuati 8 tipi di subunità α_1 : S, A, B, C, D, E, G, H.

La subunità α_1 è legata ad altre subunità importanti per il corretto funzionamento del canale: α_2 , β , δ e γ .

La prima grande differenza tra i canali si basa sulla soglia:

- **Bassa soglia:** subunità α_1 **G e H**. Si aprono a basse depolarizzazioni, inattivandosi molto rapidamente, importanti nel controllo dell'eccitabilità e dell'attività ritmica di cellule muscolari e nervose; questi canali sono definiti **T** o transienti; sono insensibili alle diidropiridine ed alle conotossine e sono bloccati dal Ni^{2+} ; hanno permeabilità analoga a Ca^{2+} e Ba^{2+} .
- **Alta soglia:** si aprono ad alte depolarizzazioni, restando aperti più a lungo, responsabili dei grandi aumenti di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ per l'azione da "secondo messaggero" di questo ione. Questi sono divisi in altri sottogruppi:
 - **L:** subunità α_1 **C e D**. Lunga durata; presenti a livello muscolare, cardiaco e cerebrale, sono sensibili al blocco da diidropiridine quali nifedipina e nimodipina.
 - **N:** subunità α_1 **B**. Neuronal; rappresentano la principale conduttanza ad alta soglia delle cellule nervose. Sono insensibili alle diidropiridine, ma sensibili alla conotossina GVIA.
 - **P/Q:** subunità α_1 **A**. Tipiche delle cellule del Purkinje del cervelletto e delle cellule granulari; hanno caratteristiche cinetiche diverse dai canali N e sono insensibili alle diidropiridine ed alle conotossine; sono sensibili all'agatossina.
- **Canale al Ca^{2+} del muscolo scheletrico:** è specializzato come **sensore** del voltaggio. Possiede una subunità α_1 **E**. In seguito a depolarizzazione si apre e permette l'ingresso dello ione; la trasformazione meccanica è trasmessa al **recettore della rianodina** dei depositi per la liberazione dello ione all'interno del sarcoplasma da cui dipende l'avvio della contrazione.

I farmaci Ca^{2+} -antagonisti

I Ca^{2+} -antagonisti sono i farmaci più noti che agiscono sui **canali L**, divisi in tre principali classi chimiche: **diidropiridine**, **fenilchilamine** e **benzotiazepine**. Sulla subunità L esistono 3 siti distinti per queste classi di farmaci.

L'azione è divisa in base al distretto:

- Vascolare: le **diidropiridine** sono i farmaci calcio-antagonisti che agiscono sulle cellule muscolari lisce, senza influenzare la risposta ad aumento del calcio intracitoplasmatico (funzione di secondo messaggero del calcio). Bloccano solo la contrazione. La **nicardipina** agisce prevalentemente sulle coronarie, mentre la **nimodipina** agisce prevalentemente sulle arterie cerebrali. Le diidropiridine sono prive di effetti sull'attività cardiaca, determinando, inoltre, un aumento inotropo e cronotropo positivo riflesso da ipotensione. Sono i farmaci di prima scelta come antiipertensivi ed antianginosi, soprattutto la **nifedipina**. Le fenilchilamine e le benzotiazepine agiscono sulle resistenze periferiche solo a concentrazioni elevate.
- Cardiaco: i Ca^{2+} -antagonisti agiscono bloccando i canali L del nodo del seno, del nodo seno-atriale, del nodo atrio-ventricolare, delle fibre di conduzione e dei miociti delle pareti contrattili. Sono importanti nel trattamento di tachiaritmie sopraventricolari, soprattutto le **fenilchilamine** come **verapamil** e **gallopamil**. A questo livello le **benzotiazepine**, il cui capostipite è il **diltiazem**, hanno potere intermedio rispetto alle fenilchilamine e le diidropiridine.
- Nervoso: qui i canali L sono molto pochi, ma sono comunque presenti. I calcio-antagonisti sono possibili farmaci da utilizzare in condizioni di eccessivo influsso di ioni calcio in caso di neurotossicità.

I maggiori effetti **collaterali** dei farmaci calcio-antagonisti, soprattutto per le diidropiridine, sono associati all'azione vasodilatante: edemi, ipotensione, nausea, cefalea. Possono precipitare precedenti stati di ischemia miocardica per riduzione del flusso coronarico e per l'effetto inotropo e cronotropo positivo sul cuore riflesso per l'ipotensione. Questi effetti sono ridotti con le fenilchilamine e con le benzotiazepine.

Altri calcio-antagonisti, quali **flunarizina** e **lifarizina**, sono allo studio come antiischemici cerebrali, per l'azione che hanno nei confronti dei canali T, oltre che ai canali L.

La modulazione dei canali al Ca^{2+} può avvenire anche mediante diversi **neurotrasmettitori**, che ne riducono l'ampiezza d'attivazione e rallentando la cinetica. Solitamente l'inibizione avviene sui canali N, nel tessuto nervoso. L'esempio classico, però, è la **stimolazione** dei canali L cardiaco da parte del **recettore β_1 -adrenergico** per l'adrenalina: effetto inotropo positivo.

I canali al potassio

I canali al potassio sono presenti in tutte le cellule eucariotiche. Questi hanno una azione **stabilizzante** su V_M : portano V_M verso il potenziale d'equilibrio del K^+ , allontanandolo dal valore soglia per il **firing** dei potenziali d'azione.

Sono divisi in tre superfamiglie in base al numero dei domini transmembrana: 6, 4 e 2; la famiglia 6TM è ulteriormente suddivisa in canali voltaggio-dipendenti e canali Ca^{2+} -attivati.

Canali 6TM

Sono caratterizzati dalla presenza di 6 domini transmembrana. Sono divisi in voltaggio-dipendenti e Ca^{2+} -dipendenti.

- **Voltaggio-dipendenti**: questi canali sono divisi ulteriormente in diverse famiglie.
 - **EAG**: hanno le peculiarità di essere chiusi da alte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e subiscono una sorta di ritardo d'attivazione se il potenziale d'azione è molto basso.
 - **ERG**: hanno il processo d'attivazione molto più rapido di quello d'attivazione, cui è legata la difficoltà di determinare elevate correnti uscenti a potenziali depolarizzati. Hanno un importante ruolo nella fase di **ripolarizzazione** del potenziale d'azione cardiaco (insieme alla corrente I_K); una loro alterazione determina la **sindrome del QT lungo**, per un aumento del tempo di ripolarizzazione cardiaca. Sono importanti, inoltre, nell'accomodazione dei treni di potenziali d'azione in cellule nervose.

Quali farmaci?

Sono gli **antiaritmici III classe**, che hanno la caratteristica di prolungare la durata del potenziale d'azione e, quindi, il periodo refrattario. Sono tra gli agenti maggiormente utilizzati nelle gravi tachiaritmie; i più importanti sono il **sotalolo** e l'**amiodarone**.

- **Ca^{2+} -dipendenti** o **KCa**: sono canali che si aprono solo se $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è sufficientemente alta; ciò è legata all'interazione con il complesso Ca^{2+} -calmodulina. Anch'essi sono divisi in due gruppi, **BK**, ad alta conduttanza, e **SK**, a bassa conduttanza. Questi canali sono legati alla formazione della fase di iperpolarizzazione delle cellule dopo un potenziale d'azione.

Quali farmaci?

Sono i cosiddetti **KCO (Potassium Channel Openers)**; tra questi i più importanti sono i composti benzimidazolici come **NS-004** e **NS-1619** che causano un rilassamento della muscolatura della trachea.

Canali 2TM

Sono composti da tetrameri a 2 segmenti transmembrana corredati e non da altre unità. Questi sono divisi in tre famiglie principali:

- **K_{ATP}** : sono canali regolati dalla $[\text{ATP}]_i$. È composto da 4 monomeri a 2TM assemblanti il poro. Questo canale deve le sue proprietà alla presenza di altre 4 subunità accessorie, **SUR_1** e **SUR_2** ;⁸ queste sono composte da 13 segmenti TM. **$\text{K}_{ATP} \text{SUR}_1$** è tipico delle cellule β -pancreatiche; **$\text{K}_{ATP} \text{SUR}_2$** è tipico dei miociti cardiaci, nei tessuti dei vasi ed in cellule nervose.

Quali farmaci?

$\text{K}_{ATP} \text{SUR}_1$ è il target molecolare delle **solfoniluree**, una classe di **ipoglicemizzanti orali**, il cui capostipite è la **tolbutamide**. Serve nella terapia del NIDDM. Il blocco del K^+ determina

⁸ SUR: recettore per le solfoniluree.

depolarizzazione della cellula β , mimando gli effetti dell'ingresso di glucosio ed aumento dell'ATP, fino al potenziale in cui si aprono i canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti che innescano il rilascio di insulina.

$\text{K}_{\text{ATP}}\text{SUR}_1$ è, inoltre, iperattivato dal **diazossido**, un KCO dall'azione **iperlicemizzante**: l'azione è completamente opposta a quella da solfoniluree.

Altri **KCO** sono attivi sui **K_{ATP}** (definiti anche come $\text{K}_{\text{ATP}}\text{CO}$), sulla muscolatura liscia dei vasi, in particolare il **cromaklim**, della trachea, dell'utero, della vescica, a livello cardiaco e nervoso, agendo sui **$\text{K}_{\text{ATP}}\text{SUR}_2$** , determinando **iperattivazione** ed aumento della polarizzazione con diminuzione della contrattilità; essi hanno grandi effetti accelerando la ripolarizzazione e accorciando la durata del potenziale d'azione, con effetto cardio e neuroprotettivo.

- **GIRK**: sono canali al potassio attivati da proteine $\text{G}_{\beta\gamma}$ per stimolazione da neurotrasmettitori. Sono presenti nel sistema nervoso e nel cuore con funzione inibitoria., implicati, ad esempio, nell'azione inibitoria vagale mediata dai recettori muscarinici dell'ACh. Nel SNC sono accoppiati a recettori M_2 muscarinici, A_1 adenosinici, μ e δ oppioidi, GABA_B , α_2 -noradrenergici, D_2 dopaminergici, 5-HT_{1A} serotoninergici e recettori per S.S.
- **Rettificatori forti e deboli**: le famiglie **$\text{K}_{\text{ir}1}$** forma i canali **ROMK**, il primo della famiglia a 2 segmenti che fu scoperto, caratterizzato da debole proprietà rettificatrice. La famiglia **$\text{K}_{\text{ir}2}$** forma, invece, canali rettificatori forti, con blocco voltaggio-dipendente da parte di cationi divalenti e/o poliammine citoplasmatiche. Queste famiglie determinano, nei **tessuti muscolari**, V_{REST} molto negativi.

I canali anionici al cloro

I canali al Cl^- sono molto importanti perché in molte questi sembrano avere, come funzione principale, quella di opporsi alla normale eccitabilità e di contribuire alla ripolarizzazione della cellula, avendo, in definitiva, una funzione stabilizzatrice come i canali al K^+ . In particolare nelle **cellule muscolari** servono per mantenere V_{REST} , negli **epiteli e nel sistema nervoso** servono per il mantenimento del volume cellulare.

Ne esistono due tipi principali:

- **CIC**: è il canale principale nelle cellule muscolari scheletriche. Una sua alterazione può determinare la patologica congenita nota come **miotonia congenita**; questi sono formati da più subunità a 12 TMS.
- **CFTR**: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; sono fondamentali negli epiteli per la secrezione mucosa. Una loro alterazione può comportare la patologia nota come **fibrosi cistica**.

Canali cationici misti

Esiste, infine, una famiglia di canali ionici con selettività mista. Questi sono divisi in due grandi famiglie:

- **CNG**: canali attivati da nucleotidi ciclici, tipici nei fotorecettori dei bastoncelli e dell'epitelio olfattivo, la cui inibizione determina un mancato spike e, quindi, un segnale. Questi sono importanti, inoltre, come coadiuvanti dei pacemaker cardiaci e nel talamo; nel cuore sono, infatti, bloccati da **nifedipina** e **diltiazem**, anche se a concentrazioni molto elevate.
- **MG**: mechanogated; sono canali meccanosensibili, bloccati da stimoli meccanici. Sono tipici delle stereociglia dei vestiboli uditivi.

POMPE E TRASPORTATORI

Fumagalli - capitolo 16

Le pompe e trasportatori sono proteine di membrana dotate di una funzione molto importante: il trasporto di elementi e molecole attraverso la barriera fisico-chimica della membrana plasmatica. Queste proteine possono effettuare diversi tipi di trasporto, che oltre a quello **passivo**, in cui la

sostanza si muove attraverso la membrana secondo il suo gradiente di concentrazione, che si possono così definire:

- **Diffusione facilitata:** le proteine svolgono l'azione di un semplice carrier ed il trasporto avviene secondo gradiente.
- **Trasporto attivo:** trasporto contro gradiente. Il trasporto avviene grazie all'energia ricavata dall'idrolisi dell'ATP, oppure grazie al cotrasporto di un contro-ione.

Il movimento di soluti può coinvolgere una o più sostanze:

- **Uniporto:** una sola sostanza.
- **Cotrasporto:** più sostanza insieme, ulteriormente diviso in:
 - **Simporto:** nello stesso senso.
 - **Antiporto:** in senso opposto.

Il trasporto è determinato dalla modificazione conformazionale delle proteine di trasporto in base al legame di quest'ultima con la sostanza da trasportare. In genere vi è una struttura molecolare conservata, per cui pompe e trasportatori sono simili nelle subunità che svolgono la funzione di trasporto; in genere presentano nella loro struttura diverse sequenze di aminoacidi idrofobici.

Le pompe

Le pompe sono, in genere, proteine costituite da due subunità, una α , con i vari siti per le sostanze da trasportare, siti per l'ATP e molecole modulatorie, ed una β , con attività prettamente stabilizzante e regolatrice.

Le subunità α delle diverse pompe presenta **8-12** domini transmembrana. Le pompe di interesse farmacologico sono la Na^+/K^+ -ATPasi, la H^+/K^+ -ATPasi e la Ca^{2+} -ATPasi; queste sono **pompe P**, perché legate, durante l'attivazione, all'idrolisi di ATP ed alla fosforilazione di un residuo di **aspartato**.

Pompa sodio/potassio – Na^+/K^+ -ATPasi

La pompa sodio/potassio è una pompa a distribuzione ubiquitaria. È caratterizzata dalla presenza di una subunità α ed una β . Quella α è quella che è attiva, ed è presente in diverse isoforme: α_1 è ubiquitaria, α_2 è presente nel muscolo scheletrico e cardiaco, e α_3 è presente nel SNC.⁹

Questa pompa, lega 3 Na^+ e l'ATP, che è idrolizzato; subisce un cambiamento conformazionale e trasporta fuori i 3 Na^+ ; in seguito lega 2 K^+ e, cambiando nuovamente conformazione, li trasporta dentro ed è pronta per un nuovo ciclo. Il trasporto di 3 Na^+ e 2 K^+ la rende **elettrogenica**, influenzando il potenziale di membrana. Le azioni principali di questa pompa sono legate all' regolazione del contenuto d'acqua nella cellula, il trasporto di soluti attraverso la membrana cellulare (negli epitelii), ed il mantenimento dei gradienti ionici in concomitanza con i rapidi cambiamenti di conduttanza della membrana (nei tessuti eccitabili).

Farmaci attivi su questa pompa

I farmaci **digitalici**, meglio conosciuti come **glicosidi cardioattivi** sono i farmaci d'elezione nel trattamento dell'insufficienza cardiaca congestizia, presentando, inoltre, effetti **neuromorali**, importanti nel migliorare l'emodinamica del paziente. Questi hanno come azione farmacologica il **blocco di Na^+/K^+ -ATPasi cardiache** (tipo α_2). Tutto ciò determina un aumento del Na^+ intracellulare con una diminuzione dell'attività dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$,¹⁰ con un aumento transitorio di $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ed un **effetto inotropo positivo**. I glicosidi attivi più diffusi sono la **digitale**, **digossina**, **digitossina** e **ouabaina**.

Pompa protonica gastrica – H^+/K^+ -ATPasi

Questa pompa è fondamentale per la secrezione gastrica dello stomaco. Questa, a riposo, è localizzato in strutture tubul-vescicali; quando è presente la stimolazione secretagoga, il rilascio del

⁹ α_2 e α_3 sono sensibili all'inibizione da digitalici.

¹⁰ Vedi capitolo 8, omeostasi del Ca^{2+} .

calcio intracellulare nelle ghiandole gastriche determina mobilitazione della pompa protonica gastrica sulla membrana; contemporaneamente si hanno correnti di **efflusso di KCl**: il K^+ ora presente sul versante extracellulare è trasportato all'interno, con il trasporto all'esterno di H^+ , che legherà Cl^- ; il rapporto dello scambio è 1:1 e questa pompa non è elettrogenica.

Questo tipo di pompe sono presenti anche sulla mucosa del colon ed i dotti collettori del rene, differendo, però, da quelle gastriche perché sono sensibili ai digitalici, ma insensibili agli inibitori della pompa gastrica.

Farmaci attivi su questa pompa

I farmaci inibitori della pompa gastrica sono alcune **benzimidazoline**, il cui capostipite è l'**omeprazolo**, che lega specificamente e irreversibilmente la pompa protonica gastrica legandosi a residui cisteinici presenti nei domini extracellulari della subunità α , che è quella catalitica.

Ca²⁺-ATPasi della membrana plasmatica

Questa pompa è un enzima che provvede alla estrusione di calcio in eccesso dalle cellule eucariotiche. Nei tessuti **non-eccitabili** questa proteina è sufficiente nel mantenimento della $[Ca^{2+}]_i$ intracitoplasmatica.¹¹

Esistono circa 4 isoforme di questa proteina; nei territori intracitoplasmatici sono presenti il sito catalitico per l'ATP, i siti di legame per fosfolipidi acidi e per il complesso **Ca²⁺-calmodulina**; il legame con quest'ultimo accelera la V_{max} della pompa.¹²

La pompa Ca²⁺-ATPasi **cellulare** (di membrana) trasporta calcio e sodio in rapporto di 1:1; la pompa Ca²⁺-ATPasi **sarcoplasmatica** trasporta, invece, calcio e sodio in rapporto di 2:1.

P-glicoproteina o ATPasi trasportatore di farmaci

La P-glicoproteina è un trasportatore di membrana espressa da diversi tumori, dopo la somministrazione di antibiotici chemioterapici. È classico l'esempio degli adenocarcinomi del colon e del rene, e leucemie. Questi determinano, infatti, con meccanismi non ancora chiari, attivazione del gene **MDR1**, che codifica per la P-glicoproteina, proteina di membrana con 12 segmenti transmembrana a due siti di legame per ATP. Questa proteina determina estrusione del farmaco dalla cellula che la esprime, determinando la **resistenza multifarmacologica**.

I trasportatori

Scambiatore Na⁺/Ca²⁺

Questo scambiatore catalizza il **controtrasporto bidirezionale** di questi ioni. È presente in alcuni epiteli, ma principalmente nei **tessuti eccitabili**. Come detto prima, la pompa sodio/calcio è sufficiente nel mantenere $[Ca^{2+}]_i$ nelle cellule dei tessuti non eccitabili. Nei tessuti eccitabili si ha una dinamica completamente differente. La depolarizzazione, infatti, permette una liberazione di calcio massiva nel citoplasma.

L'**accensione** dello scambio è regolata dalla stessa $[Ca^{2+}]_i$.

Quando la cellula è a riposo, con $[Ca^{2+}]_i \cong 100 \text{ nM}$, l'attività dello scambiatore è praticamente nulla e l'attività dell'estrusione è completamente a carico della pompa sodio/calcio. Se $[Ca^{2+}]_i \cong 500-1000 \text{ nM}$, lo scambiatore è attivo. Nella maggior parte delle cellule eccitabili a riposo, lo scambiatore estrude il calcio, ma, **durante la depolarizzazione**, il potenziale di membrana supera il potenziale d'inversione dello scambiatore, ed il Calcio è introdotto con estrusione di sodio. Nelle cellule cardiache ciò comporta un ingresso del calcio durante tutta la fase di depolarizzazione, ed una estrusione durante le fasi terminali del potenziale d'azione.

L'**attività** di questa pompa è, inoltre, influenzata da $[Na^+]_i$. Se questa aumenta, si ha riduzione dell'attività dello scambiatore, con **diminuzione dell'estrusione di Ca²⁺**. Ciò è alla base, inoltre,

¹¹ Nei tessuti eccitabili questa azione è svolta prevalentemente dallo **scambiatore Na²⁺/Ca²⁺**.

¹² Questa è influenzata da fosforilazioni da parte di PKC e PKA, ed è modulata da ormoni quali ADH, glucagone.

dell'inibizione dello scambiatore **seguito** all'inibizione della pompa sodio/potassio ad opera dei digitalici.

Cotrasporto Na^+ - K^+ - Cl^-

Il sistema di trasporto elettroneutro di sodio, potassio e cloruro è presente in molte cellule; ciò è importante in funzioni vitali quali il controllo del volume cellulare, la secrezione di liquidi e sali nelle ghiandole esocrine e il bilancio idrosalino a livello renale. In tutti i tessuti il **cotrasporto è elettroneutro**, con una stechiometria di **1 Na^+ , 1 K^+ e 2 Cl^-** . Molti fattori stimolano o inibiscono questo controtrasporto nei vari tipi di cellule, come la **vasopressina**, l'**angiotensina II** e la **bradichinina** che lo stimolano, mentre agenti che aumentano il **cAMP** lo inibiscono.

Quali farmaci agiscono su questo cotrasporto?

Il cotrasporto Na^+ - K^+ - Cl^- è il target molecolare dei farmaci quali **furosemide** e **bumetamide**, appartenenti alla classe dei **diuretici dell'ansa**. Normalmente questi cotrasportatori sono presenti alla branca ascendente dell'**ansa di Henle**, ove il riassorbimento di NaCl non è accompagnato dal riassorbimento d'acqua; qui il riassorbimento di ioni crea l'iperosmolarità interstiziale della midollare renale, condizione iniziale del riassorbimento degli ioni lungo il tubulo collettore (**meccanismo a controcorrente**).

Il blocco di questo cotrasportatore determina blocco del riassorbimento degli ioni e diminuzione del riassorbimento d'acqua. Questi farmaci sono usati, dunque, nel trattamento dell'**ipertensione arteriosa**.

Antiporto Na^+ - H^+

Molti tipi di cellule rispondono a stimolazioni fisiologiche con un aumento del pH intracellulare. L'alcalinizzazione è mediata da un **antiporto Na^+ - H^+** . Questo è importante, inoltre, per rimuovere l'eccesso di protoni causati dal metabolismo, soprattutto quello anaerobico. Il rapporto stechiometrico è di 1:1 ed la sua attività è influenzata dalla **pompa sodio/potassio**. Questo antiporto è presente sulla membrana luminale delle cellule dei tubuli e del tubulo collettore renale.

Quali farmaci agiscono su questo antiporto?

I farmaci che agiscono principalmente su questo antiporto sono i **diuretici dei tubuli e del tubulo collettore**, il cui capostipite è l'**amiodarone**. Questo determina inibizione dell'antiporto, con una **riduzione dell'ingresso di Na^+** nelle cellule tubulari. Ciò determina, infine, il **risparmio del potassio**, per la diminuita secrezione nel lume tubulare.

Antiporto Cl^- - HCO_3^-

Questa proteina è la principale proteina di membrana degli eritrociti, chiamata anche **Band 3**. Questa è fondamentale perché determina l'espulsione di **HCO_3^-** , con l'ingresso di **Cl^-** , con rapporto stechiometrico 1:1, che si accumula negli eritrociti, dopo l'attività dell'**anidrasi carbonica**; questa, infatti, coniuga la CO_2 della periferia con H_2O , con la formazione di H^+ e HCO_3^- . Lo scambio prevede Viceversa, il meccanismo opposto si verifica quando gli eritrociti sono nel polmone.

Trasporto transcellulare del glucosio

Il glucosio e gli aminoacidi sono trasportati dal lume intestinale all'interno delle cellule epiteliali intestinali, e da qui nel torrente circolatorio.

Il trasporto dal lume intestinale alle cellule avviene mediante un **simporto Glu-Na^+** . Il sodio è poi espulso nel torrente mediante la pompa sodio/potassio, mentre il glucosio passa nel sangue attraverso **diffusione facilitata** secondo gradiente di concentrazione. Questo trasportatore è chiamato **glucosio permeasi**.

Negli **epatociti** è presente un trasportatore, chiamato **GLUT2**, che ha bassa affinità, ma raggiunge saturazione a livelli fisiologici; da ciò deriva che quanto maggiore è la glicemia nella vena porta, tanto maggiore è la quantità di zucchero trasportata nel fegato che andrà incontro alla formazione di

glicogeno. Lo stesso trasportatore è presente nelle **β -cellule** del pancreas, responsabili nella regolazione della secrezione di insulina.

In tutte le **altre cellule** è presente un altro trasportatore chiamato **GLUT1**, assieme ad altri quali **GLUT3**, che ha alta affinità, ma raggiunge saturazione ai livelli di glicemia fisiologica; di conseguenza la quantità di zucchero incorporato.

Nelle cellule **adipose** e **muscolari** è presente, invece, un trasportatore chiamato **GLUT4**; questa proteina è, normalmente, presente in vescicole citoplasmatiche; il loro spostamento alla membrana è legato al legame dell'**insulina**, con un aumento della velocità di ingresso del glucosio in questi tessuti.

I NEUROTRASPORTATORI

Fumagalli – capitolo 17

I neurotrasportatori sono proteine localizzate sulle membrane plasmatiche e vescicolari intracellulari che esercitano la funzione di modulazione della trasmissione del segnale. Possono, infatti, trovarsi sulle cellule pre- e post- sinaptiche. I sistemi intracellulari consentono l'accumulo del neurotrasmettitore nella cellula.

Sia le membrane plasmatiche che quelle vescicolari sfruttano per il trasporto contro gradiente l'energia elettrica fornita da contro-ioni quali Na^+ , K^+ e Cl^- . Esistono 3 classi di neurotrasportatori:

- Trasportatori della membrana plasmatica cellulare Na^+/K^+ -dipendenti, come quelli per l'acido glutammico e l'acido aspartico.
- Trasportatori della membrana plasmatica cellulare Na^+/Cl^- dipendenti, quali quelli per il GABA, la serotonina e le catecolamine.
- Trasportatori H^+ -dipendenti associati alle vescicole sinaptiche, quali quelli per le monoamine, per l'acetilcolina e gli aminoacidi.

I trasportatori di membrana Na^+/K^+ -dipendenti per gli aminoacidi eccitatori

Il glutammato è il principale neurotrasmettitore **eccitatorio** del sistema nervoso.

L'energia necessaria per il trasportatore dell'**acido glutammico** è fornita dal gradiente elettrochimico degli ioni Na^+ e K^+ a cavallo della membrana plasmatica.

Questo trasporto è associato al **co-trasporto** di **2 Na^+** ed al **contro-trasporto** di **1 K^+** ed un **OH^-** o **HCO_3^-** . Il sistema è, quindi, **elettrogenico** e determina, inoltre, una modificazione del pH della cellula.

Il trasportatore del glutammato è chiamato **hEAAT4** (excitatory amino acid transporter 4). Questo ha una struttura di 6 segmenti transmembrana con struttura α -elica. Sono presenti, inoltre, due siti di fosforilazione tra TM3 e TM4.

EAAT è presente nelle membrane neuronali pre- e post- sinaptiche e nella membrana delle cellule gliali; ciò determina una liberazione molto veloce del vallo.

Alterazioni funzionali degli EAAT sono, probabilmente, alla base della patogenesi delle lesioni **eccitotossiche** delle malattie cerebrovascolari e neurodegenerative; le condizioni di ischemia sono associate sia a deficit energetico cellulare, che determina perdita dei gradienti ionici, ed ad aumento dei metaboliti reattivi dell'ossigeno, capaci di inibire il trasporto di glutammato. Queste condizioni, sono legate anche all'aumento di $[\text{K}^+]_{\text{extra}}$, e parallela diminuzione di $[\text{Na}^+]_{\text{extra}}$. **Il trasportatore può funzionare al contrario.**

La stimolazione eccessiva dei recettori per gli aminoacidi eccitatori determina un incremento patologico della concentrazione del calcio intracellulare, con tutte le conseguenze nocive ad esso collegate, come l'induzione delle vie del nitrossido, della fosfolipasi A_2 e della xantina ossidasi.

Gli EAAT sono un possibile bersaglio molecolare per la modulazione farmacologica della concentrazione di glutammato in casi d'ictus, per esempio, attraverso la modulazione della ricaptazione ed attraverso il blocco dell'estruzione.

I trasportatori di membrana Na^+/Cl^- dipendenti

Questa famiglia di trasportatori include quelli per:

- GABA.
- Monoamine: noradrenalina, serotonina, dopamina.
- Glicina.
- Taurina, prolina, betaina.
- Colina.

Essi sono **simporti** che utilizzano l'energia del gradiente di Na^+ prodotto dall'attività della Na^+/K^+ -ATPasi per la traslocazione del substrato attraverso la membrana. L'affinità del trasportatore per il neurotrasmettitore è positivamente modulata dalla concentrazione locale di Na^+ e Cl^- .

La struttura di questi trasportatori prevede 12 segmenti transmembrana, con 5 loop intracellulari e 6 extracellulari. Le estremità N- e C- sono intracellulari. La lunga ansa tra T3 e T4 contiene numerosi siti di glicosilazione per l'attività modulatoria. Questi funzionano come **canali**, poiché sono molti gli ioni che passano quando il trasportatore è attivo, ed inoltre è presente una certa conduttanza ionica anche in assenza di substrato.

Trasportatori per il GABA

Il GABA è il principale neurotrasmettitore **inibitorio cerebrale**. Questo trasportatore è appartenente alla famiglia dei **cotrasporti Na^+/Cl^- -dipendenti**. La struttura è quella tipica per questa famiglia, ma questo trasportatore possiede siti di fosforilazione per **PK Ca^{2+} -calmodulina-dipendente** sulle anse intracellulari.

La concentrazione di GABA nelle sinapsi ed i suoi effetti sono regolati da un meccanismo di ricaptazione Na^+ -dipendente; i trasportatori sono presenti sui **neuroni** e sulle **cellule gliali**.

Esistono diverse isoforme di **GAT**:

- **GAT₁**: 599 aminoacidi, 67 kDa. È presente nella retina, in tutto il cervello e nel midollo spinale, particolarmente nel bulbo olfattorio, nella neocorteccia, nell'ippocampo e nella corteccia cerebellare. È presente anch'essa in sede post-sinaptica sui neuroni **glutammatergici**.
- **GAT₂**: 602 aminoacidi. È presente esclusivamente sulle cellule della pia madre e dell'aracnoide.
- **GAT₃**: 627 aminoacidi. È particolarmente abbondante nella retina, nel bulbo olfattorio, nell'ipotalamo, nella corteccia mediale e nel tronco dell'encefalo.

I trasportatori per GABA sono presenti nelle terminazioni nervose GABAergiche, nelle cellule gliali e nelle membrane postsinaptiche di neuroni non GABAergici.

Come per i trasportatori degli aminoacidi eccitatori, i trasportatori neuronali e gliali di GABA possono **estrudere** il trasportatore, con meccanismo Ca^{2+} -dipendente, quando $[\text{K}^+]_{\text{extra}}$ aumenta. Ciò avviene fisiologicamente durante crisi **convulsive** e tale liberazione non esocitotica è un importante meccanismo limitante della diffusione dell'attività epilettica.

È chiaro, quindi, che l'inibizione della ricaptazione del GABA è importante per la terapia antiepilettica.

Le strategie volte a potenziare la trasmissione GABAergica si basano sull'uso di:

- **Benzodiazepine** e **barbiturici**: modulatori allosterici, che facilitano gli effetti di GABA su GABA_A .
- **γ -vinil-GABA**: inibitore della degradazione del GABA, che ne aumenta la disponibilità nel vallo sinaptico.
- **Tiagabina**: ottimo anticonvulsivante; è inibitore della ricaptazione del GABA; l'eccesso di GABA nel vallo sinaptico induce l'attivazione dei recettori inibitori GABA_B nelle terminazioni nervose **glutammatergiche**, con conseguente diminuzione del rilascio di glutammato che è il neurotrasmettitore eccitatorio per eccellenza.

Trasportatore per la serotonina

Il trasportatore per la serotonina **SERT** è tipico nei corpi cellulari serotoninergici dei nuclei del raphe 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. È anche presente negli astrociti ed in periferia sulle piastrine.

Tutti i SERT sono codificati da un unico gene, la cui **espressione** è regolata da cAMP, PKC e da meccanismi tirosin-kinasi-dipendenti. Il genere SERT è localizzato sul cromosoma 17.

L'**attività** di SERT è regolata da NO, da cGMP, nonché da fosforilazioni e defosforilazioni ad opera di PKA e PKC.

Alterazioni della ricaptazione della serotonina sono state osservate nelle piastrine e nel cervello delle persone con disturbi dell'umore. È significativa, infatti, l'associazione tra l'**allele S** del promotore e **personalità ansiosa**.

Il **SERT** è un importante bersaglio molecolare sia di farmaci antidepressivi, sia di alcune neurotossine e farmaci d'abuso.

- **Antidepressivi triciclici**: bloccano SERT e NET (trasportatore della NA). Questi farmaci, tra cui ricordiamo l'**imipramina** e l'**amitriptilina**, hanno una serie di effetti collaterali legati al blocco dei **recettori muscarinici dell'acetilcolina**.
- **SSRI**: inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina, tra cui il capostipite è la **fluoxetina** (PROZAC), ed altri come la **paroxetina**, **sertralina**, **fluvoxamina** e **citalopram**, hanno effetti selettivi di blocco del SERT senza il blocco dei muscarinici.

È riscontrato, però, che gli effetti antidepressivi degli SSRI hanno esiti maggiori se associati agli inibitori selettivi del NET come la **maprotilina**, la **viloxazina** e la **reboxetina**.

N.B. Tutti gli antidepressivi, però, interferiscono con la ricaptazione di **dopamina** su recettori dopaminergici localizzati nei **gangli della base e del sistema limbico**, comportando effetti collaterali come l'insonnia e l'agitazione psicomotoria.

- **Amfetamina** e derivati: **MDMA** (3,4-metilendiossimetamfetamina – ecstasy), **fenfluramina**, l'**MPTP** (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) e la **2-NH₂-MTMP**. Questi determinano **inversione** del trasportatore; questi ha, in effetti, siti di legame per questi farmaci sul lato extracellulare che ne permettono il trasporto verso l'interno ed il **contro-trasporto** di serotonina all'esterno della cellula. Gli effetti tossici possono essere diminuiti grazie agli antidepressivi mono- e tri-ciclici per il loro blocco del SERT.

Trasportatore di membrana per la dopamina

Il trasportatore della dopamina è anch'esso appartenente alla famiglia **Na⁺/Cl⁻ dipendente**. Questo è espresso nelle piastrine ed in numerose linee di cellule tumorali. Dopo la ricaptazione, la dopamina può essere trasportata all'interno di vescicole sinaptiche o metabolizzata ad opera delle **MAO** (monoaminoossidasi).

Il **DAT** è una proteina di circa 80 kDa con molteplici varianti nel SNC. È composto da 620 aminoacidi. La struttura è quella tipica della famiglia di appartenenza con la presenza, inoltre, nei domini TM6, TM7 e TM8, di residui di serina che ne conferisce l'affinità agli inibitori.

La trasmissione dopaminergica può essere alterata da:

- **Cocaina**: è il farmaco che, per eccellenza, determina diminuzione della ricaptazione della dopamina, **previa** liberazione esocitotica del trasmettitore provocata dall'impulso, con una continua stimolazione.
- **Amfetamina**: questa può determinare stimolazione della trasmissione dopaminergica indipendentemente dall'impulso, per **inversione** della direzione di trasporto del trasmettitore attraverso DAT. La liberazione attraverso il DAT è migliore per la **D-amfetamina**.

L'azione dell'**amfetamina** è, però, legata a diversi fattori: in un primo momento si ha l'**estrusione** delle monoamine attraverso il trasportatore, cui segue, poi, l'**inibizione di VMAT**, il trasportatore vescicolare delle monoamine, ed, infine, l'**inibizione delle MAO**. Tutti questi passaggi determinano, in definitiva, un **potenziamento della trasmissione monoaminergica** (effetto **simpaticomimetico indiretto**): ipertensione ed attivazione psicomotoria. La rapida e massiccia liberazione di amine

dai terminali provoca rapido esaurimento delle riserve e rapida diminuzione della capacità di risposta a successive somministrazioni dello stesso farmaco (assuefazione e tachifilassi).

- **Antidepressivi:** interferiscono con la ricaptazione di **dopamina** su recettori dopaminergici localizzati nei **gangli della base e del sistema limbico**, comportando effetti collaterali come l'insonnia e l'agitazione psicomotoria.

Data la sua localizzazione selettiva nelle cellule dopaminergiche, il DAT costituisce uno specifico marker di questi neuroni. Il DAT è diminuito nel **morbo di Parkinson**.

N.B. Il NET può interagire anche con la DA, in quanto la lega addirittura con maggiore affinità. In aree cerebrali dove la densità di terminazioni noradrenergiche è elevata rispetto a quelle dopaminergiche, come nella **corteccia prefrontale**, il NAT partecipa maggiormente nella liberazione delle sinapsi dalla DA. In queste condizioni, un **bloccante del NET**, come la **desipramina**, risulta essere più efficace rispetto ad un bloccante del **DAT**.

I trasportatori di membrana per la noradrenalina e l'adrenalina

I trasportatori per NA e A sono **non-selettivi**. Appartengono alla classe di trasportatori **Na⁺/Cl⁻ dipendenti** e la struttura è quella della famiglia, con una lunga ansa intracellulare tra TM3 e TM4, con diversi siti di glicosilazione.

Ogni molecola di NA trasportata è accompagnata da un elevato numero di ioni Na⁺, ma anche a riposo; per ogni molecola trasportata si muovono circa 300 ioni. Ciò determina, in condizioni di riposo, una corrente elettrica sufficiente per uno **spike**; queste correnti hanno una funzione regolatoria della trasmissione.

Il **NET** è il bersaglio di diversi classi di farmaci:

- **Antidepressivi triciclici:** bloccano SERT e NET. Questi farmaci, tra cui ricordiamo l'**imipramina** e l'**amitriptilina**, hanno una serie di effetti collaterali legati al blocco dei **recettori muscarinici dell'acetilcolina**.
- **SNRI:** inibitori selettivi del reuptake della noradrenalina. Tra questi ricordiamo la **maprotilina**, la **viloxazina**, la **reboxetina**. Questi non alterano la funzione di altri trasportatori, privi, quindi, di effetti antimuscarinici.
- **Amfetamina** e derivati: **simpaticomimetici indiretti**. **MDMA** (3,4-metilendioossimetamfetamina – ecstasy), **fenfluramina**, l'**MPTP** (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) e la **2-NH₂-MTMP**. Questi determinano **inversione** del trasportatore; questi ha, in effetti, siti di legame per questi farmaci sul lato extracellulare che ne permettono il trasporto verso l'interno ed il **contro-trasporto**. La liberazione delle monoamine attraverso il NET, al contrario del DAT, non è stereospecifica.

L'azione dell'**amfetamina** è, però, legata a diversi fattori: in un primo momento si ha l'**estrusione** delle monoamine attraverso il trasportatore, cui segue, poi, l'**inibizione di VMAT**, il trasportatore vescicolare delle monoamine, ed, infine, l'**inibizione delle MAO**. Tutti questi passaggi determinano, in definitiva, un **potenziamento della trasmissione monoaminergica** (effetto **simpaticomimetico indiretto**): ipertensione ed attivazione psicomotoria. La rapida e massiccia liberazione di amine dai terminali provoca rapido esaurimento delle riserve e rapida diminuzione della capacità di risposta a successive somministrazioni dello stesso farmaco (assuefazione e tachifilassi).

- **Cocaina:** questo farmaco determina, al pari degli antidepressivi triciclici, blocco del NET, legandosi al recettore, senza, però, esserne substrato (legame in sito diverso).

I trasportatori vescicolari H⁺-dipendenti

Questa classe di proteine è adibita al trasporto del neurotrasmettitore all'interno delle vescicole sinaptiche. L'energia per il trasporto proviene dal gradiente elettrochimico di ioni H⁺, generato da una **pompa di protoni (ATPasi)** sulla membrana vescicolare. Se la vescicola è permeabile ad un anione come Cl⁻, il gradiente elettrico è nullo, ed è mantenuto solo il gradiente chimico. In generale, in queste vescicole il **pH ≈ 5,5**.

Trasportatore vescicolare delle monoamine

Nelle cellule monoaminergiche le vescicole sinaptiche presentano un $\text{pH} \cong 5,5$ ed un $\Delta V \cong 60 \text{ mV}$. Queste condizioni fanno sì che le amine che sono immagazzinate siano subito **protonate** e, grazie ad un trasportatore speciale, complessate a nucleotidi e rese insolubili.

Il trasportatore vescicolare delle **monoamine** è il **VMAT**, poco specifico. Questo è presente in due proteine, rispettivamente di 512 e 521 aminoacidi, definite **VMAT₁** e **VMAT₂**. Il primo è tipico delle cellule cromaffini della midollare del surrene, mentre il secondo è nervoso.

I farmaci che agiscono su VMAT sono la **reserpina** e la **tetrabenazina**. Queste inibiscono VMAT, ma a differenza della amfetamina, non inibiscono le MAO, **libere, quindi, di degradare i trasmettitori**, né promuovono la liberazione delle monoamine nel vallo sinaptico. Ciò determina, effetti di **sedazione**, ed ipotensione, ipomotilità e disturbi ormonali, legati alla diminuzione del segnale per diminuzione del trasmettitore.

Trasportatore vescicolare dell'acetilcolina

Anch'esso è H^+ -dipendente, inibito dal **vesamicolo**. È nelle stesse proporzioni della colina acetil transferasi. Questo ha la capacità di prevenire l'accumulo vescicolare dell'Ach e di bloccare la neurotrasmissione. Questo è detto **VAcHT**.

Trasportatori vescicolari degli aminoacidi eccitatori e del GABA.

Questo trasporto dipende, essenzialmente, dal gradiente elettrico generato dalla pompa protonica a cavallo della membrana della vescicola.

Il trasportatore di GABA, detto **VGAT**, è sensibile all'**acido nipecotico** ed al **γ -vinil-GABA**. Questo è formato da 10 segmenti transmembrana e le estremità N- e C- terminale stanno all'interno della vescicola.

I RECETTORI INTRACELLULARI

Fumagalli – capitolo 20

Gli ormoni **steroidi**, **tiroidei** ed alcune vitamine, grazie alla struttura altamente lipofila che li caratterizza e ne permette la diffusione attraverso la membrana citoplasmatica, agiscono tramite recettori localizzati a livello intracellulare; ciò permette uno **svincolo** da tutti i processi di **trasduzione del messaggio**.

Tutti i recettori steroidi sono costituiti da un'**unica catena polipeptidica** che contiene due domini funzionali: il dominio di **dimerizzazione e legame al ligando** (C-terminale), ed il dominio di **legame** (N-terminale). Il dominio di legame al DNA è quello maggiormente conservato dal punto di vista strutturale nelle diverse famiglie, contenendo circa 70 aminoacidi, tra cui sono presenti numerose cisteine e aminoacidi basici per il legame con il DNA, che ha carica negativa; sono presenti, inoltre, sequenze **zinc-finger** che permettono il legame nel solco maggiore della doppia elica.

Il dominio di dimerizzazione e legame al ligando è quello meno conservato e determina specificità di legame.

La disposizione dei diversi recettori è varia:

- **Intracitoplasmatici**: recettori per glucocorticoidi e mineralcorticoidi.
- **Intranucleari**: recettori per estrogeni, progesterone, androgeni, vitamina D, acido retinoico e ormoni tiroidei.

I **recettori**, dopo aver legato i propri ligandi, subiscono un cambiamento conformazionale che li libera dalle proteine inibitorie (tutti i recettori citoplasmatici, in condizioni di inattivazione, sono legati a **hsp**). In seguito subiscono **fosforilazioni** da parte di chinasi attivate dal legame recettore-

ligando; i recettori, infine, subiscono **dimerizzazione** con altri recettori anch'essi attivati, e subiscono traslocazione a livello nucleare ove riconoscono sequenze specifiche di **DNA**, attivando la trascrizione di geni specifici.¹³

I recettori attivati e dimerizzati legano specifici **coattivatori**, proteine che facilitano l'interazione con il DNA, come, ad esempio, SRC-1, p/CAF, TRAM e RIP140. Questi coadiuvatori sono probabilmente, delle **acetilasi istoniche** che facilitano lo svolgimento della doppia elica.

Esistono, inoltre, meccanismi di attivazione recettoriale ormone-indipendenti, probabilmente implicati nelle fasi in cui non sono disponibili i ligandi, come durante lo sviluppo embrionale, per il differenziamento dell'apparato riproduttivo o delle cellule del sistema nervoso. Esistono, inoltre, dei meccanismi di regolazione di trascrizione dei geni anche senza interazione diretta del recettore con il DNA, grazie al controllo effettuato da coadiuvatori, o grazie a protein-chinasi/fosfatasi attivate da altri ormoni.

Questi recettori, inoltre, presentano un'alta specificità, grazie a diversi meccanismi:

- **Specificità cellulare:** un recettore può attivare diversi fattori di trascrizione, ma in ogni tessuto sono espressi fattori di trascrizione specifici.
- **Specificità delle proteine coadiuvanti.**
- **Metabolismo tissutale:** questi può differire nei vari tessuti con la formazione di intermedi attivi o non sul DNA o leganti o non le proteine coadiuvanti.

Esistono, inoltre, meccanismi di regolazione di questi recettori; possono essere di natura **autologa**, grazie ai quali i recettori possono aumentare o diminuire a seguito dei processi di attivazione, ed **eterologa**, grazie al quale l'attivazione di una via determina modificazioni del numero dei recettori di un'altra: tipico è l'esempio degli **estrogeni** nelle cellule uterine, che determina aumento dell'attività del promotore per il **progesterone**.

Come avviene la modulazione farmacologica?

L'intervento farmacologico può essere indirizzato a modificare:

- Insorgenza del segnale, modificando sintesi, immagazzinamento o secrezione del particolare ormone.
- Sensibilità del tessuto bersaglio al segnale ormonale.
- Funzionalità del recettore impiegando agonisti ed antagonisti.¹⁴

Farmaci che modulano l'attività dei recettori per gluco- e mineral-corticoidi

- **Agonisti del recettore per i glucocorticoidi:** usati nella terapia sostitutiva dell'insufficienza surrenale acuta e cronica, come immunosoppressori (inibizione della trascrizione di citochine infiammatorie, di IFN- γ , di fattori di crescita emopoietici; i corticosteroidi bloccano la **fosfolipasi A₂**, e quindi la sintesi di acido arachidonico, inibendo la sintesi di PG, leucotrieni, trombossano ed endoperossidi), nella profilassi del rigetto del trapianto d'organo, e come inibitori della iperproliferazione delle cellule mieloidi nella leucemia linfoblastica acuta e nei linfomi. I farmaci tipici sono: **cortisone**, **prednisone**, **prednisolone**, **metilprednisolone**, **betametasona**, **triamcinolone**, **dexametasone**.
- **Agonista del recettore per i mineralcorticoidi:** usato nella terapia dell'insufficienza surrenalica primaria o ipoadosteronismo; **fludrocortisone**.
- **Inibitori della sintesi steroidea:** impiegati in caso di iperfunzionamento delle ghiandole surrenali, come il **chetoconazolo** ed **aminoglutemide**.
- **Antagonisti selettivo del recettore per i mineralcorticoidi:** usato come antagonista del recettore per l'aldosterone, è un diuretico perché aumenta l'escrezione di Na⁺ e la ritenzione di K⁺; **spironolattone**.

¹³ Queste sequenze sono definite **HRE**: high responsive elements.

¹⁴ In particolare per l'uso di antagonisti, i recettori cui si legano sono capaci di formare legami con i siti specifici del DNA, ma non sono capaci di attivare la trascrizione.

- **Antagonista selettivo del recettore per i glucocorticoidi:** mifepristone.

Farmaci che modulano l'attività dei recettori per gli ormoni sessuali

- **Agonisti**
- **Estrogenici:** estradiolo, estrone, etinilestradiolo; usati come contraccettivi per la rottura dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaie, con diminuzione delle gonadotropine e del picco di LH, responsabile dell'ovulazione. Usati anche in endometriosi ed in terapia di insufficienza ovarica o nella post-menopausa (mestranolo). Gli effetti indesiderati più comuni sono i disturbi del ciclo mestruale e intestinale, ipertensione, alterazione del sistema della coagulazione plasmatico ed iperplasia uterina.
- **Progestinici:** medrossiprogesterone acetato, desogestrel, rogestimate; usate nella contraccezione. Gli effetti indesiderati sono legati all'alterazione del profilo lipidico plasmatico ed anomala tolleranza al glucosio.
- **Androgenici:** metiltestosterone, oxandrolone, stanozololo, fluoximestrone; usati in terapia d'insufficienza testicolare, ipogonadismo ipogonadotropico ed osteoporosi.
- **Antagonisti**
- **Estrogenici:** tamoxifene, raloxifene, ICI 820,780; usati nella terapia del cancro della mammella, dell'endometrio e della prostata.
- **Progestinici:** induzione di aborto nei primi mesi di gravidanza ed anticoncezionali per alterazione dell'endometrio che impedisce l'annidamento dell'ovulo.
- **Androgenici:** nel trattamento del tumore della prostata.¹⁵

Modulazione dell'attività di altri recettori

- **Agonisti del recettore per ormoni tiroidei:** usati in casi di ipotiroidismo. La tiroxina è naturale, ma si può usare l'agonista sintetico triiodotironina, come in casi d'emergenza da mixedema.

Metaboliti attivi della vitamina D: usati in caso di osteomalacia o rachitismo da bassi livelli ematici di vitamina D, come l'ergocalciferolo e colecalciferolo.

LA SECREZIONE

Fumagalli – capitolo 25

L'esistenza di una attività secretoria implica l'esistenza di processi regolatori.

Ogni processo di secrezione è energeticamente sfavorevole per le cellule e richiede la catalisi da parte di proteine di fusione, la cui attività è modulata in base allo stato della cellula. I meccanismi di **esocitosi** sono due:

- **Costitutiva:** secrezione diretta del contenuto vescicolare – le vescicole originano dal Golgi – senza la necessità di stimolazione.
- **Regolata:** è propria delle cellule specializzate, quali neuroni e cellule endocrine ed esocrine; i prodotti sono accumulati in vescicole/granuli e sono rilasciati in seguito ad un segnale, come ad esempio una depolarizzazione.

Data la notevole quantità di membrana vescicolare/granulare che si fonde con quella cellulare, esistono eccellenti meccanismi di recupero, per evitare un dispendio energetico da risintesi, che rientrano nel processo di **endocitosi**; la membrana vescicolare presenta, inoltre, un corredo proteico diverso. I neurotrasmettitori classici quali **glutammato, GABA, glicina, acetilcolina ed amine biogene** sono contenute in vescicole, con diametro sorprendentemente omogeneo di 40-50 nm e sono accumulate nei terminali nervosi. Grazie a queste dimensioni omogenee, le vescicole dei neurotrasmettitori contengono un **quanto**, ovvero un numero di molecole costante, variabile tra 10^3

¹⁵ È sempre difficile curarlo per l'**up-regulation** che i recettori per gli androgeni subiscono.

e 10^4 ; questa rappresenta la quantità più piccola di neurotrasmettitore che può essere liberata che evoca un effetto sulla cellula post-sinaptica.

I **neuropeptidi** sono presenti in granuli, con diametro variabile tra 100 e 300 nm, in tutto il soma cellulare e non nei terminali nervosi.

L'immagazzinamento dei neurotrasmettitori è mediato da specifici **neurotrasportatori**, analizzati nel capitolo 17.

Le caratteristiche della secrezione sono principalmente tre:

- L'esocitosi è un evento estremamente rapido, richiedendo poche centinaia di microsecondi per completarsi.
- L'esocitosi è caratterizzato da altissima efficienza e precisione.
- I neuroni hanno un'altissima resistenza all'**esaurimento secretivo** o **fatica**, che compare solo in caso di prolungatissime esposizioni, grazie alla presenza di un'adeguata riserva di vescicole sinaptiche e neurotrasmettitori.

Le fasi dell'esocitosi

Dato il gran numero di vescicole presenti nel citoplasma, è presumibile che solo quelle che siano in stretta vicinanza con la membrana siano reclutate per la neurotrasmissione; ogni esocitosi determina la liberazione dello 0,5-15% delle riserve di neurotrasmettitore. La stragrande maggioranza delle vescicole sono presenti nel **pool di riservacitoplasmatico**, legate a catene di actina e spectrina. Tutto il processo eso-endocitotico dura, all'incirca 1-2 minuti.

- **Rilascio dal citoscheletro**: è mediato da proteine quali le sinapsine, attivate da protein-chinasi Ca^{2+} -calmodulina dipendenti – un altro segnale precedente, quindi - che interagiscono con l'actina, determinando distacco delle vescicole.
- **Indirizzamento**: le vescicole sono legate a **proteine G monomeriche**, costituite da un monomero di circa 20-20 kDa. La più comune è la **rab-3**. Questa, in forma legata al **GTP**, si associa alla membrana vescicolare fino al raggiungimento della membrana presinaptica dove, dopo il legame con la **Rim**, idrolizza GTP e si distacca dalla vescicola. Il complesso rab-3-GDP è rende disponibile per un nuovo ciclo.
- **Ancoraggio alla membrana plasmatica**: una volta effettuato il legame rab-3-Rim, altre proteine quali sinaptotagmina, neurexina I, syntaxina e DOC2 legano con diversa "forza" la vescicola alla zona attiva di membrana. La loro concentrazione è maggiore nelle vicinanze di canali al Ca^{2+} .
- **Emifusione (priming)**: l'iniziale fusione prevede il legame tra la proteina **sinaptobrevina** (v-SNARE) vescicolare alla **syntaxina** (t-SNARE) plasmatica, con la formazione di un ancoraggio saldo ed una fusione poco efficiente alla liberazione del neurotrasmettitore. Ciò che mantiene la vescicola in emifusione è la **sinaptotagmina**.
- **Fusione completa**: un segnale cellulare qualsiasi, tramite depolarizzazione o secondo messaggero quale IP_3 , determina un aumento del Ca^{2+} ; quest'ultimo si lega alla sinaptotagmina e la distacca dalla vescicola. È, così, possibile il legame completo tra le SNAREs e la liberazione del neurotrasmettitore.
- **Riciclaggio**: dopo la liberazione le vescicole vanno incontro a riciclaggio, mediante il processo **kiss and run**, o grazie alla mediazione della **clatrina**.

Il destino del neurotrasmettitore è legato a:

- Ricaptazione del neurotrasmettitore all'interno della terminazione nervosa.
- Captazione nella cellula post-sinaptica.
- Ricaptazione nelle cellule gliali.
- Diffusione extrasinaptica.

Per quanto concerne i **neuropeptidi**, data la loro localizzazione nel citoplasma e non nei terminali sinaptici, questi sono liberati dopo **stimolazioni maggiori**; la concentrazione di Ca^{2+} a distanza dai canali aumenta molto più lentamente. I neuropeptidi, inoltre, sono sostanza **complesse** e non

possono essere sintetizzate nei terminali nervosi, ma originano sempre dal Golgi e sono mobilizzate grazie al **trasporto assonico veloce** (5 $\mu\text{m}/\text{sec}$). Risulta chiaro, quindi, che queste trasmissioni sono soggette a “fatica”. I neuropeptidi, inoltre, sono soggetti a metabolismo extraneuronale ad opera di peptidasi, che può portare alla formazione di metaboliti più o meno attivi.

Il generale, la secrezione è un processo **Ca²⁺-dipendente**.

Farmacologia della secrezione

Molte sostanze interferiscono con il trasporto vescicolare, come la **colchicina**, il **nocodazolo**, **gli alcaloidi della vinca**, la **brefeldina A** e le **tossine clostridiche**.

LA FARMACODINAMICA

Rossi – capitolo 2

Un **farmaco** è una sostanza esogene: **xenobiotico**; va somministrato in corso di patologia. I farmaci sono divisi in diagnostici, veleni e medicamenti.

L'azione farmacologica

Una sostanza introdotta in un organismo può comportarsi come:

- **Inerte**: se non interferisce con la materia vivente.
- **Alimento**.
- **Farmaco**: in grado di far variare una o più attività funzionali.

L'attività farmacologica è legata, in effetti, ad interazioni chimiche, fisiche o chimic-fisiche.

L'azione farmacologica può essere diretta o indiretta:

- **Diretta**: mima l'effetto di una sostanza endogena. Es.: ASA acetila le COX.
- **Indiretta**: modificano la fisiologia di un sistema e ciò induce delle modifiche su altri sistemi. Es.: antidepressivi aumentano i livelli di 5-HT, con modifiche al Sistema Limbico.

Ogni azione prevede un **effetto**:

- **Fondamentale**: quello terapeutico. Es.: ASA \downarrow PG.
- **Secondario**: un altro effetto terapeutico non principale. Es: ASA \downarrow sintesi TXA₂ \downarrow agg. piast.
- **Collaterale**: non voluto. Es.: ASA \downarrow PG nella mucosa gastrica \downarrow ulcera.
- **Tossici**: reazioni anafilattiche, alterazioni della flora batterica ecc...

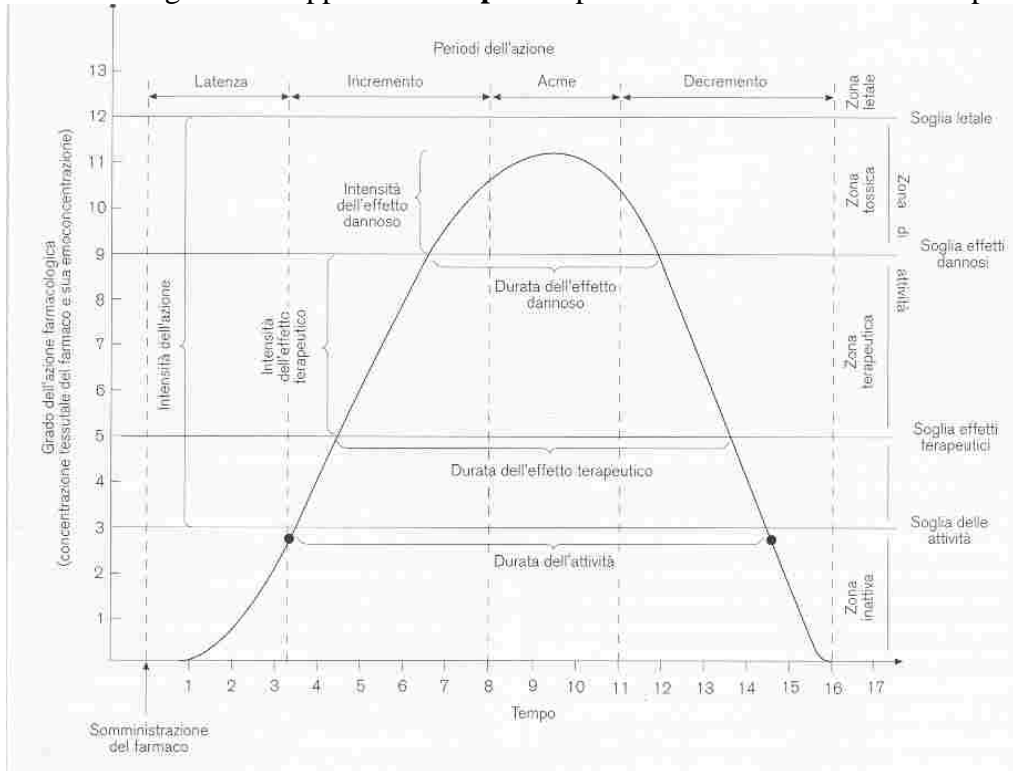
→ Ricorda la differenza tra azione ed effetto.

L'azione farmacologica è, in genere, **dose-dipendente**: effetto dose-proporzionato, cioè è tanto maggiore quanto più alta è la dose. In altri casi l'azione può essere, ma raramente, **tutto o nulla**.

Le caratteristiche dell'azione farmacologica sono:

- **Qualità**: \uparrow o \downarrow di una attività fisiologica. L'azione farmacologica può essere, inoltre, **mono- o bi-fasica**. L'azione monofasica prevede un solo tipo di effetto. L'azione bifasica prevede un effetto iniziale, seguito, all'aumentare delle dosi, da un effetto negativo. Es.: Ca²⁺-antagonisti hanno effetti di diminuzione della contrazione a basse dosi, ed ad alte dosi determinano shock.
- **Intensità**: quantità dell'effetto.
- **Durata**: persistenza dell'effetto in funzione della **cinetica del farmaco** (vedi oltre).
- **Andamento**: decorso dell'effetto. Esistono, in generale, due tipi d'andamento. L'andamento tipico è quello ad **S allungata** (effetto in funzione della dose): la prima fase prevede bassi effetti a basse dosi. La fase centrale prevede, invece, aumenti notevoli dell'effetto con piccole dosi. La fase finale prevede, infine, un plateau, ovvero piccole aumenti dell'effetto anche con alte dosi di farmaco. L'andamento parabolico, invece, a saturazione, ma con alte risposte a basse dosi e poi una fase di latenza, è meno frequente. Esiste anche un andamento rettilineo, con effetti proporzionali alle dosi, ma è molto molto rarissimo.
- **Latenza**: tempo che intercorre tra la somministrazione del farmaco e l'effetto.

- **Incidenza:** si parla di azione costante se è presente nel 100% della popolazione. È in funzione dello stato psico-fisico del paziente.
 - **Reversibilità:** alcuni farmaci non hanno reversibilità; significa che l'effetto scompare quando si ha ritorno allo stato originario. Es.: antagonisti irreversibili. ASA nelle piastri.
- L'azione farmacologica è in rapporto al **tempo**. Il tipo d'azione è funzione del tempo:



Si possono definire, in genere, tre tipi d'azione: una prima fase è il periodo di latenza, una fase centrale, corrispondente al picco della curva, è la fase d'azione (l'azione è, generalmente, più lunga dell'effetto), ed una fase finale, di decremento. Quest'andamento è tipico della somministrazione **per os**. Per **e.v.**, infatti, si ha una diminuzione della fase di latenza.

LA FARMACOCINETICA

Rossi – capitolo 3

Se la farmacodinamica è la scienza che si occupa dell'azione dei farmaci, la **farmacocinetica** è la scienza che si occupa della cinetica di un farmaco, ovvero l'assorbimento, il trasporto, la ripartizione ovvero distribuzione, del metabolismo ed infine escrezione.

Vie di somministrazione

Sono divise in naturali ed artificiali:

- **Naturali:** tutte le mucose accessibili, polmone, cute, digerente e congiuntiva...
- **Artificiali:** oltre le mucose; e.v., i.m., intradermica, sottocutanea, intratecale, intracardiaca...

Assorbimento

L'assorbimento consiste nel passaggio del farmaco **dall'esterno al sangue**, ed è, spesso, un passaggio mediato. I passaggi sono diversi a seconda dell'ostacolo che il farmaco deve superare.

Il passaggio fondamentale, indipendentemente dalla via di somministrazione (vedi dopo), è quello attraverso le **membrane biologiche**, che, come sappiamo, sono un mosaico di lipidi anfipatici e proteine... vabbé lo sappiamo, saltiamo!

La penetrazione attraverso queste strutture può avvenire tramite:

- **Trasporto passivo:** circa il 70%. È l'evenienza più diffusa e risponde alla legge di Fick, secondo cui la diffusione avviene in base al ΔC .
- **Filtrazione:** questo passaggio prevede la presenza di **pori** sulle membrane. È tipico, per esempio, a livello **capillare**, ove questi hanno diametro massimo di **4 nm**. Al contrario, i pori delle **emazie** o dell'**epitelio intestinale**, e della maggior parte delle membrane, ha un diametro massimo di **0,4 nm**, permettendo il passaggio di molecole di massimo **100-200 daltons**.
- **Trasporto facilitato / attivo:** permette l'assorbimento di a.a., zuccheri, ioni, basi puriniche/pirimidiniche, in base al ΔC . Ciò prevede la presenza di **carrier** specializzati, nel caso di trasporto facilitato, e di **carrier-pompe** nel caso di trasporto attivo, legato a **dispendio energetico**. Questi tipi di trasporto sono sempre **saturabili**.
- **Pinocitosi / fagocitosi:** invaginazioni della membrana cellulare che ingloba una gocciolina del mezzo extra-cellulare e ne integra il contenuto nel citoplasma.

N.B. Le condizioni di trasporto degli **elettroliti deboli** e dei farmaci trasportati da **proteine** dipendono dal mezzo, dalla loro ΔC ai lati della membrana. Numerosi farmaci sono, inoltre, **acidi/basi deboli**, per cui il loro trasporto dipende dal **pH** del mezzo e dal loro **pK_a**.

Tratto gastro-intestinale

Sebbene tutto il tratto gastro-intestinale possa, in teoria, servire come sede d'assorbimento, i tratti in cui questo avviene, in pratica, sono cavità orale, stomaco, intestino tenue e retto:

- **Cavità orale:** a livello sublinguale, con diffusione passiva di elettroliti deboli non ionizzati e sostanze lipofile. Questa via salta il primo passaggio epatico (vedi oltre – Distribuzione). Questa via è usata per somministrare farmaci inattivati dal pH acido gastrico.
- **Stomaco:** il pH qui varia da 1 a 3-5 (dopo pasto). Sono assorbiti bene gli **acidi deboli**, presenti in forma non ionizzata. L'alcalinizzazione del succo gastrico con HCO_3 è utile per assorbire basi deboli, come il paracetamolo o i parasimpaticolitici.
- **Tenue:** pH è 5-7 ne duodeno, 6,3-7,3 nel digiuno e 7-8 nell'ileo. Queste caratteristiche permettono l'assorbimento di basi deboli, ma anche di acidi deboli con $pK_a < 3$. È possibile modificare l'assorbimento dei farmaci modificando il loro pK_a .
- **Colon / retto:** come nel tenue, ma la minore superficie è limitante. L'assorbimento avviene mediante i plessi emorroidali e quelli **inferiori** permettono il salto del primo passaggio epatico.

Esistono **diversi fattori** che modificano l'assorbimento gastro-intestinale. Qualsiasi farmaco è assorbito entro **1-3 ore** con questo tipo di somministrazione. La legge di diffusione indica che l'assorbimento è funzione della superficie assorbente, così come del tempo di permanenza. Una piccola quota di farmaco può essere assorbita anche mediante la **rete linfatica**, specialmente i farmaci lipofili. Ciò permette il salto del primo passaggio ed è fondamentale nell'assorbimento di proteine, colesterolo, vitamina K, acidi grassi.

Cute

È tipico quando si vogliono ottenere effetti locali, sia superficiali che profondi. Sebbene l'epidermide sia una barriera impermeabile, che permette l'assorbimento di farmaci come gli esteri organofosforici, altamente liposolubili, le sostanze esterne penetrano grazie alle **ghiandole sebacee**. Con le **forme percutanee transdermiche** (cerotto), si possono somministrare farmaci, come nitroderivati, clonidina, estrogeni, in modo da minimizzare gli effetti collaterali.

Mucose accessibili

Tutte le mucose accessibili, come quella nasale – spray nasale, possono permettere l'assorbimento di farmaci, come ossitocina e vasopressina, che potrebbero essere distrutti dall'acidità gastrica.

Apparato respiratorio

Questo apparato permette un assorbimento molto rapido ed efficace, per la grande superficie alveolare e l'alta permeabilità. Si salta il primo passaggio epatico. Questa via è tipica nei casi di emergenza cardiaca, che permette la somministrazione di atropina e adrenalina, così come nel trattamento dell'asma, con broncodilatatori, cortisonici ecc...

Vie parenterali

Sono 4: endovenosa, intramuscolare, sottocutanea e intratecale (subaracnoidea).

- **Endovenosa:** è la meglio. Permette l'infusione continua con concentrazione costante.
- **Sottocutanea / intramuscolo:** assicurano una posologia precisa ed un assorbimento rapido, saltando il primo passaggio. La velocità d'assorbimento varia molto, per fattori come la perfusione. Si può migliorare massaggiando il sito d'iniezione. In soggetti ipotesi è un casino (morfini in paziente con shock da trauma – scarsa analgesia).
- **Intratecale (subaracnoidea):** la barriera emato-encefalica è un ostacolo duro. In caso di infezioni (meningiti), si procede con questa via, così come in caso di anestesi locali (oppioidi).

Distribuzione dei farmaci

Completato l'assorbimento, i farmaci si distribuiscono nei liquidi interstiziali e cellulari. Gli organi che ricevono più farmaco sono cuore, fegato, rene ed encefalo, poi tutti gli altri. La più spiccata **idrofilia** o il legame a **proteine plasmatiche** sono fattori limitanti il processo di distribuzione.

Legami farmaco-proteici

Alle dosi terapeutiche i farmaci si legano alle proteine plasmatiche, specialmente le **albumine**. Questo legame determina una **inattivazione** transitoria, in quanto le proteine agiscono da **accettori** temporanei. I tipi di legame variano in base alle proprietà del farmaco:

- **Acidi deboli:** forma ionizzata con forte affinità per albumina.
- **Basi deboli:** forma non ionizzata con bassa affinità per l'albumina ed alta per α_1 -glicoproteina.

La fissazione proteica può interferire con la **cinetica** del farmaco, soprattutto per i farmaci che sono **acidi deboli**, che a pH **7,4** sono legati ad alta affinità all'albumina. Ciò può determinare un **aumento** dell'emivita del farmaco per ritardo della distribuzione. Alcuni farmaci, come il *Warfarin* o i *Sulfamidici* hanno un forte legame con le proteine plasmatiche e la loro emivita è molto lunga; determinano, inoltre, importanti effetti di **spiazzamento**, con aumento della concentrazione di tiroxina o BRB (BRB grave nei neonati per possibili danni al SNC). Diversi fattori possono influenzare questa capacità di legame, come l'ipoalbuminemia da gravidanza o malattie epatiche, o l'iperalbuminemia da IR, esercizio fisico o ipotiroidismo.

Ripartizione del farmaco nell'organismo

La ripartizione del farmaco nei vari tessuti avviene sempre grazie a **barriere lipoproteiche**: è importante che i farmaci siano abbastanza **lipofili** da superare queste barriere, attraverso pori o per diffusione passiva, facilitata ecc... (vedi sopra). Farmaci scarsamente liposolubili hanno difficoltà nel superare questa barriera ed hanno un'alta concentrazione ematica. Esiste, inoltre, una importante proprietà che un farmaco può possedere o no: l'**organotropismo**. Farmaci come i **glicosidi digitalici** hanno un forte organotropismo verso il tessuto muscolare scheletrico e per avere una buona azione, devono essere somministrati in dosi d'attacco molto alte nei pazienti giovani adulti. Una particolare attenzione, inoltre, va posta nei soggetti **anziani** perché la loro massa muscolare è minore.

Distribuzione dei farmaci nel SNC

Nel SNC esistono diversi ostacoli che un farmaco deve superare, diverse barriere:

- **Emato-encefalica:** le cellule dei capillari encefalici non presentano né pori, né ponti intercellulari, né vescicole pinocitotiche, per cui i farmaci devono passare solo per **diffusione** passiva in base alla loro liposolubilità. È tipico l'esempio delle **penicilline** che non passano.¹⁶
- **Emato-liquorale:** i plessi coroidei sono situati in corrispondenza del pavimento del terzo e quarto ventricolo e sulla parete dei ventricoli laterali; non impediscono il passaggio di farmaci liposolubili, ma tutte le altre sostanze devono penetrare nelle cellule dei plessi prima di passare.
- **Liquor-encefalica:** l'ependima e la pia madre. L'ependima è una puttana e fa passare quasi tutto, mentre la pia madre, grazie all'alto numero di cellule astrocitarie, è in grado di impedire il passaggio di molecole di grandi dimensioni.

La presenza di barriere è importante in alcuni casi, come ad esempio la somministrazione di penicillina G che è epilettogena. In altri casi è un danno, come nel Parkinson, perché la DA non passa e bisogna trovare altre vie. Ricorda, però, che stress metabolici alterano la barriera!

Metabolismo dei farmaci

Il metabolismo dei farmaci è una delle vie di **eliminazione**, anche se questi possono anche essere eliminati senza metabolismo, ovvero così come sono. Le reazioni di metabolismo avvengono, tipicamente, per farmaci **liposolubili e poco dissociati**, grazie alle quali si formano molecole più polari e maggiormente eliminabili. Le reazioni di metabolismo avvengono quasi sempre nel **fegato**, specialmente a livello del REL (frazione microsomiale), grazie a sistemi enzimatici adibiti all'azione su sostanze esogene (alimenti, sostanze tossiche ecc...).

Altri sistemi enzimatici hanno localizzazione preferenziale anche a livello polmonare, renale e plasmatico.

Alcuni esempi:

Enzimi	Localizzazione	Attività
Microsomiali	Epatica – Ubiquitaria –	Ossidazioni. Idrolisi, riduzioni, glucuroconiugazioni.
Citoplasmatici	Citoplasmatica	Perossidasi, ossidasi, deidrogenasi.
Mitocondriali	Mitocondriale	Monoaminossidasi.
Plasmatici	Plasmatica	Esterasi specifiche e aspecifiche.

Nel fegato avvengono, essenzialmente, due tipi di reazioni, divise in prima fase (non sintetiche) e seconda fase (sintetiche).

Reazioni di prima fase – non sintetiche

Le reazioni di prima fase servono per introdurre un **gruppo funzionale** al farmaco che serve, poi, come punto d'attacco per sistemi di coniugazione nelle reazioni di seconda fase. Le reazioni di prima fase sono ossidazione, riduzione e idrolisi:

- **Ossidazione:** comprendono l'idrossilazione di gruppi contenenti O o N e deaminazioni ossidative. Avvengono quasi tutte ad opera del **CITOCROMO P-450 OSSIDASI**, un insieme di enzimi di circa 100 isoforme diverse a diversa espressione genica. Esistono delle eccezioni, come la deidrogenazione dell'etanolo grazie ad una **ALCOL DEIDROGENASI**, o come la sintesi di acido urico grazie alla **XANTINA-OSSIDASI**, o alla ossidazione delle amine grazie alle **MAO**.
- **Riduzione:** sono meno comuni, ma molto importanti, come la riduzione del Warfarin al suo chetone, o come l'attivazione di farmaci come cortisone e prednisone, perché somministrati in forma di chetoni e poi ridotti nei rispettivi derivati idrossilati ed attivi.
- **Idrolisi:** non coinvolgono i sistemi epatici, ma sono ubiquitarie. Esteri e amidi (procaina e procainamide) sono suscettibili di reazioni di idrolisi.

¹⁶ In casi particolari come stress metabolici (ischemia/ipossia, ipo-ipertermia, aumento assunzione dell'alcol), si ha alterazione della barriera con passaggio di farmaci poco liposolubili come le penicilline o gli antimuscarinici (gas nervini).

Reazioni di seconda fase – sintetiche

Le reazioni di seconda fase sono definite sintetiche perché provvedono all'aggiunta di nuovi gruppi molecolari nei farmaci che possono aver subito reazioni di primo passaggio. Le reazioni sono tutte di **coniugazione**:

- **Glucuroconiugazione**: aumenta la solubilità dei metaboliti che possono essere eliminati con la bile o con le urine. Ciò avviene grazie alle **UDP-GLUCURONILTRASFERASI**, che coinvolgono composti fosforici ad alto contenuto energetico che cedono acido glicuronico.
- **Metilazione o acetilazione**: la maggior parte di queste reazioni hanno come donatori l'acetil-CoA o la S-adenosilmetionina.

Queste reazioni sono fondamentali perché alcuni farmaci possono essere somministrati come **profarmaci**, come il cortisone od il prednisone, e sono, poi, attivati. Queste reazioni, possono, in generale, avere tre effetti diversi, con la formazione di:

- Metaboliti inattivi: cloramfenicolo → non + antibiotico.
- Metaboliti ugualmente o maggiormente attivi: imipramina o diazepam.
- Metaboliti con attività opposta: isoprenalina (β -stimolante) → metossiprenalina (β -bloccante).

L'insieme di queste reazioni sono conosciute come **effetto i primo passaggio**. Ciò è importante da ricordare perché alcuni farmaci, come la lidocaina, l'ASA, l'imipramina, subiscono queste reazioni e la loro attività può variare.

Interferenza al metabolismo dei farmaci

- Specie: acetilatori lenti e veloci (razza bianca).
- Età: spt nei neonati si ha scarso corredo enzimatico ed immaturità della barriera emato-encefalica, così che farmaci come cloramfenicolo e analgesici oppioidi possono essere tossici.
- Gravidanza: l'aumento di progesterone comporta diminuzione dell'attività della **UDP-GLUCURONILTRASFERASI**.
- Dieta: regime ipoproteico o ipocalorico provoca riduzione dell'attività metabolica per diminuita attività dei sistemi enzimatici.
- Stress: aumento delle reazioni ossidative.
- Affezioni epatiche: ittero, cirrosi, epatite, provocano maggiore sensibilità ai farmaci, ma anche la formazione di glicuro- e solfuro-coniugati sballati che possono fare cose strane.
- Radiazioni ionizzanti: attivazione della biotrasformazione dei farmaci.

Biotrasformazione e tossicità

Alcuni farmaci hanno la peculiarità di dar vita, grazie spt a reazioni di ossidazione, a metaboliti fortemente reattivi; questi sono, normalmente, idrossilati o coniugati subito. In caso di farmaco-induzione (vedi dopo), accelerazione dell'attività del **CITOCROMO P-450 OSSIDASI**, diminuzione del glutatone disponibile, questi metaboliti reattivi non sono tutti eliminati e possono interagire con i costituenti nucleofili delle cellule con conseguente necrosi.

Eliminazione dei farmaci

Tutti i farmaci ed i metaboliti possono essere eliminati grazie ai sistemi emuntori. Tre fattori sono fondamentali: legame alle proteine, ionizzazione in base al pH, biotrasformazione.

I farmaci possono essere eliminati così come sono o come metaboliti. Farmaci e metaboliti possono interagire determinando reazioni **farmacocinetiche** che possono influenzare l'escrezione.

Eliminazione renale

L'eliminazione renale prevede la filtrazione glomerulare, la secrezione tubulare attiva, ed il riassorbimento tubulare.

- FG: circa 140 ml/min. I capillari glomerulari permettono il passaggio di sostanze, sempre in forma non ionizzata, il cui peso molecolare varia da 20 a 68 kDa. Solo le sostanze in forma libera possono essere eliminate così. Di un farmaco, circa il 20% è eliminato per FG.
- Secrezione tubulare attiva: indipendente dal legame con le proteine plasmatiche, prevede sistemi di trasporto diversi per acidi e basi deboli. Circa l'80% del farmaco è eliminato così.
- Riassorbimento tubulare: questo avviene, tipicamente, per le sostanze endogene, come a.a., ioni ecc..., grazie ad un trasporto attivo ed uno passivo. Quello passivo tiene sempre conto della forma ionizzata in base al pH.

Il **pH urinario** è molto importante. In caso di **intossicazioni** si può provvedere all'**acidificazione** delle urine per eliminare farmaci basici, ed all'**alcalinizzazione** per eliminare farmaci acidi.

Eliminazione renale e circolo enteroepatico (enteropat't!)

Numerosi farmaci e metaboliti possono essere riscontrati nelle feci e derivano dalla via biliare. Accanto ai processi di trasporto per acidi e basi deboli, il fegato possiede un terzo sistema di trasporto per le molecole immodificate. nUmerose sostanze sono, in genere, **glicuroconjugate** dalla bile e trasportate alla bile. In alcuni casi si instaura quello che è definito come **circolo enteroepatico**. Circa il 20% di un farmaco, come la digitossina, la morfina, il stibestrola ed il cloramfenicolo, possono essere glicuroconjugate e poi idrolizzate, ritornando libere e possono essere riassorbite aumentando la propria **emivita**. Altri farmaci, come il cromoglicato sono eliminati attraverso la bile in forma immodificata.

Altre vie

- Latte: circa 1%/24h, eccezione per iodio e tiouracile (5%).
- Polmone: anestetici volatili come l'alotano, antisettici come l'eucaliptolo, alcol, solventi.
- Sudore: bromo, etanolo, ASA, sulfamidici.
- Saliva e lacrime.
- Vie **artificiali**: lavanda gastrica, diarrea provocata, diuresi osmotica, dialisi peritoneale, emodialisi, exsanguino-trasfusione (IR acuta o cronica renale o epatica, intossicazioni varie).

Parametri farmacocinetici

Biodisponibilità

La biodisponibilità è la misura della **frazione di principio attivo libero** nel circolo generale e la **velocità** con cui lo raggiunge. È da ricordare, inoltre, che i farmaci subiscono processi di primo passaggio, e che possono essere non liberi ma intrappolati alle proteine plasmatiche. Si usano metodiche farmacodinamiche e farmacocinetiche. La metodica **farmacodinamica** prevede la misurazione nel tempo dell'intensità di un effetto farmacologico. La metodica **farmacocinetica** prevede la misurazione della concentrazione del farmaco (o dei metaboliti) attivo nei liquidi biologici. Queste misurazioni sono importanti perché la **quantità di farmaco disponibile** può essere calcolata mediante lo studio dell'**AUC**: Area Under Curve, ovvero lo studio dell'Area sottesa dalla curva **C = f(t)** (concentrazione in funzione del tempo). Maggiore è l'area, maggiore è la biodisponibilità di un farmaco. La **velocità** può essere misurata mediante la costante di assorbimento e valutata mediante il picco delle concentrazioni plasmatiche o urinarie ed il tempo necessario per raggiungere il picco. Le proprietà fisico-chimiche di un farmaco modificano la biodisponibilità. Due prodotti sono definiti **equivalenti** quando contengono gli stessi principi attivi, e sono definiti **bioequivalenti** quando sia la velocità sia la biodisponibilità sono pressoché sovrapponibili (differenza max del 20%).

Volume apparente di distribuzione - V_d

Rappresenta il volume in cui tutto il farmaco si distribuisce in maniera uniforme per dare la concentrazione plasmatica osservata; si indica con V_d ed è definito apparente perché esprime il volume di liquido che sarebbe necessario per contenere tutto il farmaco presente nell'organismo. si calcola mediante **iniezione e.v. rapida**, rapportando la dose somministrata alla concentrazione plasmatica al tempo 0 e si esprime in litri. In base al volume di distribuzione si può definire il tipo di distribuzione.

Emivita – tempo di dimezzamento – $t_{1/2}$

Indicato con $t_{1/2}$ è il tempo necessario affinché un farmaco passi da una concentrazione X a X/2.

$$t_{1/2} = 0,963/K_n$$

K_n esprime la costante di eliminazione del farmaco. Serve solo nei processi farmacocinetici di **primo ordine**, ovvero quei processi in cui la velocità de processo di dimezzamento è funzione della concentrazione del farmaco.

Clearance

Rappresente il volume plasmatico che è depurato dal farmaco nell'unità di tempo. Può essere epatica, renale o totale (epatica + renale). È espressa in ml/min. Cl renale si calcola:

$$C_x = (U_x V)/P_x$$

La Cl epatica è la quantità di farmaco metabolizzata a livello epatico e si calcola:

$$Cl_x = F (C_a - C_b)/C_a$$

Steady State

È lo stadio di equilibrio che si raggiunge dopo 4-5 somministrazioni ripetute del farmaco (4-5 emivite). Corrisponde alla concentrazione del farmaco che resta uguale poiché il farmaco eliminato è rimpiazzato da farmaco nuovo.

PROBLEMI RELATIVI ALL'USO DEI FARMACI

Rossi – capitolo 6

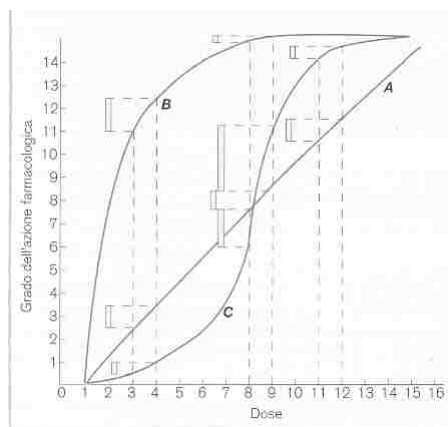
Attività farmacologica e dosaggi

I rapporti tra dose del farmaco ed azione sono regolati da due leggi:

- **I:** qualità o tipo d'azione. Con il crescere della dose compare, inizialmente, un effetto stimolante, a dosi basse, seguito, poi, a dosi alte, da un effetto inibente a dosi alte (raro il contrario).
- **II:** al crescere della dose corrisponde l'aumento, per una data azione, dell'intensità, della durata e della frequenza dell'effetto, con riduzione del tempo di latenza.

La relazione **dose-effetto** può essere studiata su un sistema di assi cartesiani, ove, riportando sulle ascisse la dose crescente e sulle ordinate il grado d'azione crescente si possono trovare:

- **Curva ad S italica:** tipica, divisa in tre fasi (A).
- **Andamento parabolico:** meno frequente ma comune, corrispondente alle fasi seconda e terza della S italica (B).
- **Rettilineo:** rara, con aumenti direttamente proporzionali o non (C).
- **Iperbolico:** è possibile solo in teoria.



Il rapporto dose-azione e il suo andamento al variare delle dosi è di fondamentale importanza per caratterizzare l'efficacia farmacologica di un composto e il modo in cui questa muta.

Considerando il numero delle dosi **D**, che è infinito teoricamente, è possibile identificare le dosi usabili praticamente **Du**, che sono quelle **minime**, non inferiori al p.m. del farmaco, e quelle **massime**, che sono quelle che saturano la capacità recettiva della via di assorbimento del farmaco. Entro questi limiti si studiano le dosi di interesse pratico **Dp**, suddivisibili in tre fasce:

- **I**: dosi inattive farmacologicamente.
- **II**: dosi attive farmacologicamente:
 - **II_a**: dosi dotate di attività non dannosa ma utile **Dn**.
 - **II_{a1}**: dosi minime.
 - **II_{a2}**: dosi efficaci divise in attività blanda, media e forte, tutte medicamentose **DM**.
 - **II_{a3}**: dosi massime.
 - **II_b**: dosi sottate di attività dannosa e tossica **Dt**.
 - **II_c**: dosi dostate di attività letale fino ad incidenza del 99% **DI**.
- **III**: dosi costantemente ed uniformemente letali.

La zona delle dosi medicamentose **DM** è quella zona in cui le dosi sono in grado, con relativa costanza (la frequenza più vicina al 100% in una data popolazione), di **esplicare** l'effetto desiderato entro un certo tempo, per una data durata e per una certa potenza. Queste dosi devono indurre una modificazione di almeno il **30%** della funzione dell'organismo, poiché fino al 20% entrano in gioco sistemi omeostatici di regolazione.

La **zona maneggevole** di un medicamento è quella zona in cui un farmaco, da dose minima a massima, può essere impiegata a scopo utile e medicamentoso senza arrecare danno. Un valore che determina l'attività positiva del farmaco è il **quoziente terapeutico**, che è il rapporto tra dose media tossica e dose media medicamentosa. In pratica clinica si utilizza, invece, il calcolo di un rapporto analogo: **DL₅₀/ED₅₀**. Questo è il rapporto tra la **Dose Letale 50%** (dose in grado di far apparire l'effetto letale – morte o variazione fisiologica – nel 50% dei trattati), e **Dose Efficace 50%** (dose in grado di far apparire l'effetto medicamentoso nel 50% dei trattati).

Il **pD₂** è, infine, un valore che esprime l'affinità del farmaco per il **recettore** ed è calcolato come logaritmo negativo della concentrazione molare capace di provocare il 50% dell'effetto massimale. Farmaci dotati di elevata affinità per il recettore hanno alto pD₂ e sono tanto più attivi quanto più è basso la loro ED₅₀.

$$\begin{aligned} \uparrow \text{pD}_2 &= \uparrow \text{affinità recettoriale} \\ \downarrow \text{ED}_{50} &= \uparrow \text{attività} \end{aligned}$$

Per **valore limite** della dose farmacologicamente attiva si intende la quantità di dose del farmaco che bisogna superare affinché appaia la prima azione farmacologica. Ciò avviene per legame con proteine ecc..., se hai studiato gli altri appunti lo sai tranquillamente... ☺.

Interazioni tra farmaci

Interazioni farmacocinetiche

- **A livello dell'assorbimento:** tipici sono quelli somministrati per os. Un farmaco può modificare la ripartizione di un altro farmaco in un dato ambiente. Le modificazioni possono coinvolgere la diffusibilità, la ionizzazione, pK_a , coeff. olio/acqua, capacità assorbente della via di somministrazione (variazione della superficie d'assorbimento o tempo di contatto con la superficie), variazioni della permeabilità ed altre. Es.: antiacidi e tetracicline; queste formano complessi con il calcio e l'alluminio che sono molto poco assorbibili.
- **A livello del legame farmaco-proteico:** molti farmaci sono legati alle proteine plasmatiche con legami non covalenti reversibili. Due farmaci possono competere per uno stesso sito di legame dell'albumina, essendo quest'ultima la proteina di trasporto principale. Se uno dei farmaci ha maggiore affinità, determina **spiazzamento** dell'altro, facendone aumentare la concentrazione libera nel sangue, quindi la sua attività. Ciò avviene tipicamente con i farmaci acidi deboli che hanno alta affinità con l'albumina (fenilbutazone – spiazzamento del Warfarin → aumento attività anticoagulante, sulfonamidici – spiazzamento della BRB → ittero, anticoagulanti cumarinici, salicilati, metotrexate, clofibrato ecc...).
- **A livello della metabolizzazione:**
 - **FarmacoINDUZIONE:** l'attività dei farmaci è correlata alla velocità con cui questi sono metabolizzati dai sistemi enzimatici farmaco-metabolizzanti (microsomiali), sia perché possono originarsi metaboliti inattivi, sia perché possono originarsi metaboliti ugualmente o maggiormente attivi (diazepam, imipramina, fenilbutazone, ciclofosfamide). L'attività dei sistemi farmaco-metabolizzanti può essere **stimolata o inibita** dalla somministrazione cronica di molti farmaci o sostanze di impiego comune, come antisettici, insetticidi, idrocarburi. Si parla, quindi, di **farmacoINDUZIONE** quando un farmaco stimola questi sistemi enzimatici, con l'alterazione dell'azione di un altro farmaco somministrato contemporaneamente. Si parla, quindi, di **farmaci INDUTTORI**.¹⁷ Es.: induzione della degradazione degli **anticoagulanti cumarinici** ad opera di farmaci induttori quali gli ipnotici, sedativi, antidolorifici, antireumatici, alcuni antibiotici. I rischi sono ovvi: trombosi, la sospensione può determinare emorragie gravi, difficoltà di controllo su PTT. Alcuni farmaci induttori, inoltre, sono capaci di stimolare il proprio metabolismo e sono definiti **autoINDUTTORI**. Il risultato è, spesso, un aumento del metabolismo con l'instaurazione di **tolleranza**: l'esempio tipico è la tolleranza che si instaura negli asmatici cronici alle dosi abituali di idrocortisone 100 mg e.v..
 - **FarmacoREPRESSIONE:** la farmacorepressione è l'inibizione mediata da un farmaco del metabolismo di un altro farmaco, attraverso interazioni a livello microsomiale. Esistono, quindi, i casi di eterorepressione ed autorepressione. Questo meccanismo spiega alcuni casi di farmacoipersensibilità o farmacoaccumulo. L'esempio classico è quello legato all'uso delle **I-MAO**, che inibiscono la principale via catabolica delle amine biogene. Esse possono associarsi a gravi reazioni se usate con derivati efedrinici (es.: vasoconstrictori nasali) o tiramina che liberano catecolamine: queste possono svolgere le proprie azioni sistemiche perché non metabolizzate in quanto sono presenti le I-MAO. Un altro esempio importante è legato a farmaci quali antidolorifici o antipiretici (fenilbutazone o ASA), chemioterapici (cloramfenicolo) o anticoagulanti (bis-idrossicumarina), che reprimono il metabolismo della tolbutamide determinando gravi sindromi ipoglicemiche.
- **A livello dell'escrezione:** la via renale, oltre a quella epatica, biliare, polmonare, cutanea, è senza dubbio la via escretrice più importante. Le alterazioni possono svolgersi, infatti, sia a livello glomerulare che tubulare:

¹⁷ L'induzione può essere abolita somministrazione di inibitori della sintesi di proteine: puromicina, actinomicina D.

- **Riassorbimento e FG:** i farmaci ad **alta idrosolubilità** sono sempre presenti ad alte concentrazioni nei tubuli e la loro quota escreta è sempre molto alta, anche se la frazione ionizzata è molto alta. Al contrario, i farmaci ad **alta liposolubilità** sono poco escreti per via urinaria. Solo la frazione libera non legata alle proteine è filtrata attraverso il glomerulo. Per questi farmaci, il grado di riassorbimento dipende dalla quota non ionizzata, dipendente dal pK_a e, quindi dal pH del mezzo acquoso. Urine **alcaline** favoriscono la ionizzazione di farmaci acidi deboli a pK_a tra 3 e 6,5, mentre urine **acide** favoriscono la ionizzazione di farmaci basi deboli a pK_a tra 7,5 e 10,5. In questi casi si ha escrezione urinaria dei farmaci.

Acidi deboli = pK_a tra 3 e 6,5 \Rightarrow escrezione con urine alcaline.

Basi deboli = pK_a tra 7,5 e 10,5 \Rightarrow escrezione con urine acide.

- **Secresione e riassorbimento tubulare:** a livello dell'epitelio tubulare esistono, specialmente nella **pars recta** del tubulo contorto prossimale, diversi sistemi di trasporto attivo specializzati per i cationi o per gli anioni, che sono, infatti, fortemente legati alla proteine plasmatiche. In questi casi farmaci selettivi per questi tipi di trasporto possono alterare l'escrezione urinaria di questi farmaci. Un esempio classico è il **probenecid**, che, inibitore della secrezione delle sostanze escrete a livello tubulare, con accumulo di penicillina, salicilati, sulfonamidici, indometacina.

Alterazioni farmacodinamiche

Le interazioni farmacodinamiche hanno come base tutti i meccanismi tipici di agonismo ed antagonismo descritti nel capitolo 4 (interazioni farmaco-recettore). Questi determinano, generalmente, effetti positivi, con aumento dell'attività medicamentosa, riduzione della tossicità, aumento della tolleranza del soggetto, miglioramento della preparazione farmaceutica, o effetti totalmente opposti a questi, cioè tutti negativi. Si parla, quindi, di **sinergismo**, se gli effetti sono positivi (sinergismo positivo, negativo, additivo, sottrattivo, con potenziamento o inversione), o di **antagonismo** (diretto, indiretto, bilaterale, unilaterale). Gli effetti possono essere vari in base al sistema che interessano:

- Assorbimento esterno: variazioni del pH, aumento dello svuotamento gastrico, della secrezione biliare ecc... Un esempio sono le tetraciclina con gli antiacidi, con la formazione di composti chelati che non servono a niente.
- Interazioni a livello emoplasmatico: l'esempio tipico è lo spiazzamento, come avviene con i sulfamidici che spiazzano gli anticoagulanti come il Warfarin con gravi rischi emorragici.
- A livello metabolico: induzione o repressione. Tipico esempio è la rifampicina, ad alto potere inducente, che aumenta l'attività anticoagulante degli anticoagulanti orali, l'attività antiipertensiva degli ACE-I, verapamil e metoprololo, quella immunodepressiva della ciclosporina ecc...
- A livello escretorio: tipico è l'esempio del probenecid (vedi sopra) che può aumentare le concentrazioni di vari chemioterapici come i chinolinici, penicilline e cefalosporine.

Interazioni tra farmaci ed alimenti

I rischi connessi all'interazione tra farmaci e alimenti vanno dalla comparsa di deficit nutrizionali alla modificazione dell'azione del farmaco. Sono tipicamente presenti nell'anziano. I meccanismi secondo i quali un farmaco determina deficit di un alimento, minerali, ecc... sono vari e sono legati a chelazione, altri lo adsorbono, altri lo solubilizzano, modificano il pH del mezzo d'assorbimento con eliminazione ecc... Nei casi in cui le perdite degli alimenti siano eccessive, si rende necessario l'integrazione dell'alimento. Lo stesso può succedere per i farmaci.

Reintroduzione dei farmaci

La somministrazione unica di un farmaco è una circostanza abituale con i prodotti diagnostici. Si usa, invece, nella pratica clinica, la somministrazione multipla. Un farmaco può sviluppare, sia in dose singola che in dose multipla, diverse circostanze:

- Sviluppo d'azione medio-normale e sempre eguali.
- Sviluppo d'azione con efficacia superiore, in cui si ha aumento delle azioni del farmaco per frequenza, intensità o durata (vedi, inoltre, farmacoaccumulo dopo).
- Sviluppo d'azione con efficacia superiore con aumento progressivo della frequenza, intensità o durata dell'effetto.
- Sviluppo d'azioni con efficacia decrescente.
- Con il ripetersi delle somministrazioni si sviluppa la tendenza a cambiare segno delle azioni.
- Le azioni farmacologiche possono essere alterate o sostituite: farmacosostituzione, farmacotrasformazione, farmacoallergia.

In particolare esistono due eventi importanti, gli effetti da sospensione e la farmacoiposensibilità.

Effetti da sospensione

Questi sono conosciuti come sindrome da sospensione (withdrawal syndrome) e effetto rimbalzo (rebound). Questo quadro clinico è tipico in farmaci sospesi bruscamente, che si manifesta con un inacidimento della sintomatologia patologica, per modificazione dei sistemi di metabolizzazione e/o escrezione, modificazione acquisita della reattività delle strutture biologiche bersaglio dell'azione farmacologica: corticosteroidi, clonidina, β -bloccanti, BDZ.

Farmacoiposensibilità

La farmacoiposensibilità o farmacoiporeattività o farmacoabitudine o farmaco-resistenza acquisita (mitridatismo)¹⁸ possono svilupparsi in un arco di tempo variabile e si parla di **tachifilassi** per un tempo breve e di **bradifilassi** per un tempo lungo. L'abitudine è un processo che si stabilisce per la **dose** e non per il farmaco; è necessario, quindi, aumentare la dose. Se un soggetto va in contro a sospensione del farmaco, attraversa un periodo definito di **astinenza** durante il quale possono manifestarsi sindromi cliniche tipiche fino a che si ristabiliscono i meccanismi fisiologici di sensibilità-reattività al farmaco, e con essa la normalità dell'azione farmacologica per l'azione impiegata. L'abitudine e la resistenza farmacologica si dicono omologhe se sono sempre per uno stesso farmaco o classe, eterologhe se anche per altri farmaci. Si definisce, inoltre, semplice o terapeutica, se la sospensione non determina disturbi né accende il desiderio di buscarsi altro farmaco, mentre si dice **tossicomaniaca** o **tossicodipendente** o **allucinogena** se la sospensione del farmaco porta a sbalzo completo. L'abitudine/resistenza è sempre reversibile.

Farmacoaccumulo

Il farmacoaccumulo è una condizione in cui si ha un accumulo del farmaco. Ciò può avvenire per rallentamento della eliminazione del farmaco, per somministrazione di farmaci farmacoinduttori o farmacorepressori, per somministrazione troppo ravvicinata di una nuova dose; in questi casi la nuova dose determina un aumento dell'azione farmacologica con sbalzo dell'effetto farmacologico.

Reazioni avverse ai farmaci

Per reazione avversa al farmaco **RAF** (Adverse Drug Reaction, ADR) si intende una manifestazione clinica (segno e/o sintomo) non desiderata, conseguente e causata dalla somministrazione di un particolare farmaco. Per definirla bisogna avere:

¹⁸ La farmacoabitudine si definisce **falsa** quando esistono delle modificazioni patologiche dei sistemi d'assorbimento che impediscono un'ottima distribuzione del farmaco.

- Nocività dell'evento.
- Indesiderabilità dell'evento.
- Rapporto o sospetto causa/effetto, tra l'introduzione del farmaco e l'insorgenza della reazione avversa.

Dal punto di vista clinico nelle RAF sono inclusi tutte le modificazioni che peggiorano lo stato di un malato. Tutte le RAF impongono diminuzione della dose del farmaco e/o sospensione del trattamento. La definizione di RAF impone che queste si manifestino **non** per abuso o sovradosaggio. **N.B.** Si intende **evento indesiderato** quando non esistono dati sufficienti per dimostrare la relazione farmaco/evento: assenza del nesso somministrazione/evento.

Una reazione avversa può essere:

- Lieve: non modifica le abituali attività dell'individuo.
- Moderata: compromette le abituali attività.
- Grave: se impedisce le attività consuete. Inoltre sono gravi tutte quelle reazioni che determinano morte del soggetto, se lo pone in pericolo di vita, se causano invalidità grave o permanente.

Tutte le RAF possono essere reversibili o irreversibili. In base all'**incidenza** sono divise in frequenti (+10%), occasionali (-10%), rare (-1%). Secondo la **successione cronologica**, ogni RAF può essere immediata, tardiva o transgenerazionale. Dal punto di vista **clinico** ogni reazione può essere distinta, secondo la classificazione di **Rawlins e Thomas**, in:

- Tipo A - augmented: caratterizzate dall'estensione dell'attività farmacologica, legato ad eccesso dell'azione farmacologica primaria, ad azione farmacologica secondaria, a scarsa selettività d'azione.
- Tipo B - bizarre: caratterizzate da una risposta al farmaco qualitativamente anormale e apparentemente non correlata alle azioni farmacologiche note di quella molecola. Queste dipendono principalmente dalle caratteristiche genetiche del soggetto, legate a idiosincrasia, reazioni immunologiche, anomalie del paziente, alterazione del farmaco.

Ogni medico in Italia è obbligato per legge a segnalare all'ASL di competenza ogni RAF grave entro 24 ore (legge n. 531 del 29/12/1987).

I **medicamenti** che più frequentemente offrono RAF, in ordine di pericolosità, gli anestetici generali, sangue ed emoderivati, chemioantibiotici, anticoagulanti, antimicotici, antiflogistici, farmaci del sistema endocrino, vaccini, psicofarmaci, antipertensivi ecc...

Gli **organi** più colpiti sono, in ordine di frequenza decrescente, gli organi dell'apparato digerente, la cute, le sezioni dell'apparato cardiovascolare, la periferia nervosa ed il sistema nervoso centrale, il rene e gli organi che concorrono al metabolismo, l'apparato ematologico, le strutture osteoarticolari..

Reazioni tossiche

La caratteristica fondamentale della reazione tossica è la **dose-dipendenza**. Sono considerate tossiche quelle reazioni che avvengono per emiconcentrazioni del farmaco superiori a quelle massime accettate in medicina, per un accentuato assorbimento, difetto di metabolizzazione ecc...

Le reazioni tossiche sono divise in:

- Farmacologiche: costituiscono un'estensione dell'effetto farmacologico o rappresentano un'azione farmacodinamica indesiderata.
- Patologiche: determinano una specifica malattia d'organo.
- Genotossiche: sono causa d'alterazione del patrimonio genetico.

Sono locali o sistemiche e gli effetti dannosi diminuiscono al diminuire della dose. Esiste, inoltre, la tossicità ritardata, che si manifesta dopo un certo periodo dalla somministrazione del farmaco.

Reazioni idiosincrasiche

La farmacoidiosincrasia è la forma più classica di farmacoipersensibilità o farmacoiperreattività congenita che può manifestarsi per motivi genetici in risposta a vari farmaci. Tipica è l'**anemia**

emolitica in soggetti con carenza di **G6PDH** trattati con farmaci ossidanti come la primachina, nitrofurantoina ecc... Altri esempi sono:

- Nitriti: per la presenza di HB anormali possono indurre metaemoglobinemia.
- Anestetici generali: alotano, metossifluorano; inducono ipertermia maligna Aut. Dom..
- Isoniazide ed altri metabolizzati per acetilazione: intossicazioni.
- Succinilcolina: deficit della **PSEUDOCOLINESTERASI**; determina apnea di lunga durata.

Reazioni allergiche

Le reazioni allergiche ai farmaci sono legate al coinvolgimento del sistema immunitario e legate ad una precedente sensibilizzazione. Molti farmaci fanno questo scherzetto e bisogna stare attenti. Esistono diversi test per sgamare tutto ciò:

	IgE	IgM	IgG
Reazioni mediate da anticorpi			
Emoagglutinazione passiva	-	++	++
Radioimmuno Assay	++	-	(++)
Degranulazione basofila	++	-	-
Liberazione di istamina	++	-	-
Test di fissazione del complemento	-	++	++
Reazioni mediate da cellule			
Stimolazione in vitro di linfociti del sangue periferico da parte dell'antigene			
Liberazione di linfocine (MIF, LIF) in vitro			
*++ test opportuno; - test non opportuno			

Le reazioni sono divise in quattro gruppi principali in base al meccanismo patogenetico:

- **I**: interazione degli anticorpi IgE sulla superficie dei mastociti, basofili, in assenza di complemento e con liberazione massiva dei mediatori della flogosi. Tipiche le reazioni allergiche da penicillina, insulina, che si manifestano con reazioni pomfo-edemato-eritematose al volto ed al collo, da trattare subito con adrenalina, antistaminici, cortisonici.
- **II**: detta anche **citolitica/citotossica**; è dovuta ad anticorpi IgG, IgM che si fissano a determinanti antigenici delle membrane e ne inducono al lisi per attivazione del C'. Queste reazioni possono colpire le emazie (anemia), i neutrofili (neutrofilia), le piastrine (porpora trombocitopenica), la membrana basale dei tubuli dei nefroni (nefropatie interstiziali), l'endotelio vescicale (cistite allergica).
- **III**: interazione di IgA, IgM, IgG libere nel plasma, in presenza di C', con l'aptene, che da vita ad ICC che si depositano nei tessuti creando certi casini...: polmone (polmonite interstiziale), media e avventizia dei vasi (periarterite nodosa, granulomatosi allergica, granulomatosi di Wegener, vasculite daipersensibilità, arterite gigantocellulare; possono determinare anche LES.
- IV**: reazioni cellulari o cellulo-mediata o ritardata, in base alla sensibilizzazione di linfociti T. Si possono avere dermatiti da contatto, febbre da farmaci (liberazione di agenti pirogeni), stomatite allergica, rinite, gastroenterite allergica, itteri, colangiti pancreatici, cazziti...

La sperimentazione dei farmaci

La ricerca di una nuova molecola farmacologicamente prevede due fasi principali, una pre-clinica ed una clinica.

Fase pre-clinica

Questa fase parte con lo **screening** di un folto numero di molecole, fino a 10.000, in modo da sondare le loro caratteristiche, ricercare eventuali brevetti, scegliere le vie di sintesi, valutare gli eventuali scopi terapeutici. La sintesi e la produzione prevede il rispetto di diversi protocolli CEE atti ad assicurarne la validità e l'efficacia. Dopo circa 3 anni si arriva a stabilire un insieme di sostanze, circa 20-30, delle quali si sceglieranno solo quelle che hanno le caratteristiche migliori per la sperimentazione clinica. Durante i test di screening vanno raccolti un cuofano di documenti in modo che le autorità, in Italia il Ministero della Sanità, approvi l'inizio della sperimentazione pre-clinica.

Fase pre-clinica 1

Questa fase tende a studiare, principalmente, i possibili effetti terapeutici della sostanza e la tossicità acuta, gli eventuali effetti indesiderati e dannosi. Tutte le bestiole sacrificate e le loro caratteristiche devono sempre essere scritte e conservate, così come ogni volta che una di queste si busca una pera e se schiatta, come schiatta ecc... Le prove di **tossicità** sono quelle fondamentali in questa fase e sono effettuate dopo mono-somministrazione, somministrazione continua ecc... Tutte le prove devono essere effettuate per lo meno, su ogni bestiola, per 14 giorni. Qui si cominciano a prendere informazioni circa le caratteristiche farmaco-cinetiche e farmaco-dinamiche, soprattutto le relazioni dose/effetto, dose/mortalità e la DL_{50} .

Fase pre-clinica 2

Questa fase prevede, invece, studi volti alla conoscenza di tutte le caratteristiche di queste sostanze, con molta attenzione alla tossicità, registrando sempre, ovviamente, un sacco di info sugli agnellini sacrificali. Sono effettuate prove di tossicità cronica (2-4 settimane), tossicità subacuta (30-90 giorni), tossicità per la funzione riproduttiva, durante l'embriogenesi, durante la gravidanza, allattamento, somministrando le pere sempre a due tipi di agnellini sacrificali (sempre un roditore e poi un cane/scimmia/maiale), con tre tipologie di dosi: basse, medie, alte.

Gli studi di **mutagenesi** vengono effettuati mediante test d'induzione di mutazioni in batteri, in sistemi eucarioti, con test di aberrazione cromosomica in colture di cellule di mammifero, ed infine, con un test in vivo di danno genetico.

Gli studi di **cancerogenesi** sono volti, invece, al riscontro di alterazioni tipiche della patologia cancerosa, come l'anoressia, la perdita di peso, sempre in tante bestiole di razze diverse, ma questa volta, sono molte di più. Questi vanno effettuati subito dopo lo svezzamento – mica se li possono godere 10-15 giorni di vita normale – e poi possono essere prolungati anche per anni, o per sempre.

Le prove **farmacodinamiche** e **farmacocinetiche** servono a valutare quantitativamente e qualitativamente le caratteristiche del farmaco (non ricordi le caratteristiche dinamiche e cinetiche? Asino! Ripeti gli altri capitoli! Pirla!).

Dopo che circa 5000 topolini e svariate centinaia di cani, scimmie e maiali venduti ai macelli che, caro lettore, hai sicuramente assaggiato, il Ministero della Sanità dice, forse, che si può andare avanti.

Sperimentazione clinica

Questa fase serve al medico per capire perché, in effetti, tutte quegli animaletti carino sono stati assassinati. E forse anche per capire che effetto hanno le pere sull'uomo: informazioni su un impiego razionale, conoscendo l'incidenza e le caratteristiche di effetti terapeutici ed indesiderati.

La sperimentazione clinica avviene, ovviamente, solo se il rischio è accettabile. Possono essere inclusi nella sperimentazione anche chi ha fatto il guaio, se il farmaco è da utilizzare in gravidanza e se non esiste altro modo per studiarlo, nei bambini accompagnati da preti gay pedofili, negli anziani, solo se il farmaco è per patologie da 3° e 4° età.

Fase clinica I

Dura 24-30 mesi e si serve di circa 20-80 soggetti, pagati molto bene. Questa fase serve per capire: comportamento farmacocinetico e farmacodinamico, tollerabilità del farmaco ecc... Si passa alla fase successiva solo se il profilo cinetico e dinamico è stato capito bene bene, ok? Abbiamo un po' di decenza e si usano soggetti sani.

Fase clinica II

Questa fase dura 12-24 mesi, con max 200 soggetti, e serve per capire se il farmaco ha + effetti utili che effetti sballati, e, dettaglio poco trascurabile, per quale patologia potrà servire. Dopo capito questo si fa vomitare e sgagazzare un po' dei 200 pagati in modo tale da scoprire la **posologia giusta**. La tecnica migliore per fare ciò è la randomizzazione.

Puoi, se hai mazzo, scoprire qualche nuova indicazione terapeutica, e se vuoi, ricominci daccapo.

Fase clinica III

Questa fase prevede lo studio in molte persone, circa 3000, forse pagati un po' meno, e dura 12-24 mesi. Serve, per capire gli effetti indesiderati dei farmaci, le reazioni avverse, soprattutto per somministrazioni prolungate, in confronto a quelle causate da farmaci noti. I soggetti sani sono mischiati a soggetti malati, spt quelli che hanno la stessa malattia per cui il farmaco è indicato. Se si ha mazzo, dopo circa 8-10 anni di lavoro il Ministero della Sanità accetta il farmaco e devi sperare che il tuo farmaco nuovo di zecca non sia un pacco come gli inibitori selettivi delle COX-2.

Fase clinica IV

In effetti per sapere se davvero hai culo e sei ricco o se ti devi suicidare perché sei calvo e senza una lira, devi aspettare per vedere se la gente che si fa le pere del tuo farmaco si sente meglio o no. Questi studi sono molto importanti e si fondono con la farmacovigilanza.

FARMACOVIGILANZA

La farmacovigilanza comprende un insieme di attività mirate allo studio sistematico dei benefici e dei rischi derivanti dall'uso dei farmaci in commercio, coinvolgendo tutta la categoria dei medici curanti. Questa corrisponde alla **Post-Marketing Surveillance PMS** anglosassone. Lo scopo principale è quello di sgamare gli effetti terapeutici ed indesiderati, tollerabilità ed efficaciae, infine, le RAF potenzialmente gravi. Il monitoraggio delle RAF prevede, infatti, un controllo sulle reazioni note e non note, così come per le RAF rare, specifiche e non specifiche, le RAF per trattamenti prolungati, da interazione, a lunga latenza ed, infinite, quelle in gruppi a rischio, cioè gruppi di pazienti con le stesse caratteristiche e/o patologie, confrontate con soggetti random.

I metodi si basano su studi descrittivi ed analitici.

Studi descrittivi

Mirano alla documentazione degli effetti indesiderati in una popolazione non basandosi sull'uso di un gruppo di controllo parallelo.

- Segnalazioni spontanee: in Italia il medico prescrittore è obbligato. Le segnalazioni sono scarse.
- Studi senza controllo parallelo:
 - Immissione in commercio registrata: immissione dopo che un certo numero di pazienti ha assunto il farmaco ed ha segnalato tutto ciò che gli è capitato.
 - Immissione in commercio limitata: si basa sul monitoraggio dei ricoveri e decessi trattati con nuovo farmaco, si basa su popolazione scelta, cioè malata.
 - Immissione in commercio controllata: prescrizione ed accurato follow-up mediante questionari.
 - Immissione in commercio ristretta: come la controllata, ma solo con medici selezionati.

- Programma di monitoraggio dell'industria farmaceutica: le informazioni sono raccolte attraverso i centri nazionali o regionali di raccolta delle ricette.
- Valutazione retrospettiva della tollerabilità del farmaco: raccolta delle prime 100.000 ricette del nuovo farmaco e l'identificazione e controllo dei primi 10.000 sottoposti a terapia. È fatto solo dalle autorità nazionali.
- Analisi dei registri nazionali: attingendo agli uffici statistici nazionali informazioni sulla frequenza nella popolazione di particolari patologie attribuite ad un certo farmaco. Questo prende in considerazione anche i ricoveri ospedalieri. Sarebbe il metodo migliore, ma c'è parecchia inaccuratezza e mancano registri di reazioni avverse organo/apparato-specifici.

Studi analitici

Gli studi analitici si basano sul confronto con un gruppo random di controllo, documentando la relazione causa-effetto tra farmaco e patologia. Questi possono essere sperimentali o osservazionali. Negli studi **sperimentali** i pazienti sono divisi casualmente in due gruppi, trattati e placebo. Negli studi **analitici** i pazienti sono assegnati al gruppo trattati e placebo a discrezione del medico.

Studi sperimentali

- Studi di coorte: gruppi trattati e placebo seguiti nel tempo segnalando l'incidenza di malattie di particolare interesse e confrontate.
- Studi di coorte orientati alla **popolazione**: qui il destino clinico dei soggetti sottoposti a trattamento è confrontato con quello di pazienti non trattati. Due metodiche: record linkage (registrazione su supporto magnetico) e monitoraggio intensivo (senza supporto magnetico – Boston Collaborative Drug Survey Programme e Aberdeen-Dundee System).
- Studi di coorte orientati al **farmaco**: hanno come obiettivo l'analisi degli effetti attribuibili al trattamento con un composto, indipendentemente dalle caratteristiche cliniche del paziente. Due metodiche: monitoraggio degli eventi associati alla prescrizione (due coorti, trattati e controllo – farmaco simile di controllo - , raccolta di info dalla data di prescrizione ed analisi dei risultati), monitoraggio degli eventi maggiori (raccolta di info dalla data di prescrizione e controllo con un paziente non trattato scelto a caso per caratteristiche simili).

Studi analitici

Studi caso-controllo: gruppo di persone che soffre di una patologia e che costituiscono i casi; i dati relativi sono confrontati con quelli di altre persone scelte a caso retrospettivamente. Questi studi permettono di scoprire reazioni avverse rare o inusuali, senza, però, l'incidenza assoluta.

IL MONITORAGGIO DEI FARMACI

Rossi – capitolo 11

I progressi ottenuti in ambito tecnologico-chimico, che consentono di ottenere dati quantitativi e qualitativi assai affidabili sulle concentrazioni dei farmaci nell'organismo rendono disponibili, tempestivamente, dati di laboratorio indispensabili per adattare la dose e la posologia al singolo caso patologico e per impostare le indagini sul profilo farmacocinetico di un nuovo prodotto.

Il **profilo farmacocinetico** di un farmaco deve essere indagato avendo come obiettivi principali la documentazione qualitativa e quantitativa degli aspetti tossicologici relativi alla preparazione.

Considerando che, tra tutte le proprietà cinetiche e dinamiche di un farmaco, solo l'**assorbimento** è controllabile dal medico e dall'industria farmaceutica, in quanto è funzione delle caratteristiche fisico-chimiche molecolari, gli scopi principali del monitoraggio terapeutico dei farmaci nei liquidi biologici sono quelli di fornire informazioni sull'andamento della terapia farmacologica, documentare il raggiungimento ed il mantenimento della concentrazione del farmaco a livello desiderato.

Lo strumento più importante per il monitoraggio terapeutico dei farmaci è la determinazione dei livelli **ematici** e/o **urinari** del composto e/o dei suoi metabolici più o meno attivi

farmacologicamente. È necessario che i campioni ematici siano prelevati in condizioni di livello costante, che, come sappiamo, si raggiungono dopo almeno 4 emivite; risulta ovvio, quindi, che nei casi di somministrazione di farmaci ad intervalli corrispondenti all'emivita, il prelievo deve essere effettuato nel momento intermedio tra le due somministrazioni.

N.B. Tutti i dati forniti dagli esami di laboratorio devono essere confrontati con i dati clinici. Esistono delle condizioni, quali Insufficienza Epatica o Renale, alterazioni del legame alle proteine plasmatiche (ipoalbuminemia, patologie epatiche o renali), diverse condizioni fisio-patologiche, come l'ipokaliemia, ipercalcemia, che devono essere valutate con cura. In particolare tutte le forme che alterano gli **emuntori**, condizioni di **polifarmacoterapia**, gravidanza, obesità, insorgenza rapida di edemi, patologie cardiache, sindromi depressive e malattie neuronali, alterazioni respiratorie importanti ecc...

In generale lo studio della concentrazione ematica dei farmaci deve permettere l'analisi e l'adeguamento delle concentrazioni dei farmaci. Qui di seguito sono elencati alcuni farmaci per i quali si richiede il monitoraggio:

Antiepilettici Acido valproico, carbamazepina, difenilidantoina, etosuccimide, fenobarbital, primidone	Chemioterapici antineoplastici Metotrexato ecc.
Antidepressivi Litio, amitriptilina, desipramina, imipramina	Immunosoppressori Ciclosporina
Oppioidi agonisti e antagonisti Morfina, petidina, metadone, propossifene, pentazocina, naloxone, naltrexone	Antinfiammatori Acido acetilsalicilico, salicilato di sodio
Benzodiazepine	Anticoagulanti Warfarin
Steroidi Estrogeni, cortisolo, anabolizzanti	Antiarritmici Amiodarone, chinidina, disopiramide, procainamide, lidocaina, propafenone, mexiletina
Sostanze di abuso Cocaina, amfetaminici, tetraidrocannabinolici	Ca²⁺-antagonisti Verapamil, diltiazem ecc.
Teofillinici	β-bloccanti Propranololo ecc.
Chemioterapici antibatterici aminoglicosidici Amikacina, dibekacina, streptomina, kanamicina, gentamicina, netilmicina, sisomicina, tobramicina	Digitalici Digossina, digitossina ecc.
Altri chemioterapici antibatterici Cloramfenicolo, vancomicina, isoniazide	Ormoni Insulina, tiroxina, liotironina ecc.

Di seguito sono indicate le concentrazioni terapeutiche per molti farmaci di uso comune:

FARMACI	INTERVALLO TERAPEUTICO (µg/ml)	DOSI TOSSICHE (µg/ml)
Analgesici		
Acido acetilsalicilico	100-250	>300
Paracetamolo		>200
Antibiotici aminoglicosidici		
Gentamicina	5-10	Picco >12; pre-dose >2
Tobramicina	5-10	Picco >12; pre-dose >2
Amikacina	15-25	Picco >32; pre-dose >10
Anticonvulsivanti		
Fenobarbital	15-40	>40
Fenitoina	10-20	>25
Primidone	5-15	>15
Carbamazepina	6-12	>15
Etosuccimide	40-100	>100
Acido valproico	50-100	>200
Clonazepam	0,02-0,07	0,18
Broncodilatatori		
Teofillina	10-20	>20
Cardiovascolari		
Digossina	1-2 ng/ml	Adulto 3-5 µg/kg; Bambino 10-15 µg/kg
Chinidina	2,3-5	Adulto 10-20 µg/kg; Bambino 15-60 µg/kg
Propranololo	50-100 ng/ml	?
Psicofarmaci		
Litio carbonato	0,8-1,2 mEq/l	2,0 mEq/l
Amitriptilina	120-250 ng/ml	>500 ng/ml
Nortriptilina	50-150 ng/ml	>300 ng/ml
Imipramina	150-250 ng/ml	>500 ng/ml

Di seguito sono indicati i test più comuni per il monitoraggio:

Metodi cromatografici
Cromatografia su strato sottile (TLC)
Gascromatografia (GC)
Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)
Metodi spettrometrici
Spettrofotometria nell'ultravioletto (UV)
Fluorimetria (FLUOR)
Polarografia (POL)
Spettrometria di massa (MS)
Colorimetria (COL)
Metodi radioisotopici e di competizione per il legame proteico
Metodi radioisotopici (RA)
Metodi immunoenzimatici (FIA, EMIT, ELISA, EFIA)
Metodi radioimmunologici (RIA)
Metodi immunologici (IA)
Metodi immunonefelometrici (NIA, RNIA, NIHA)
Metodi immunologici di conteggio delle particelle (PACIA)
Metodi immunologici di luminescenza (LIA), di chemiluminescenza e di bioluminescenza
Metodi immunofluorimetrici (FIA, SLFIA, FILA)
Metodi immunofluorimetrici in luce polarizzata (FPPIA)
Metodi enzimatici (EA)
Metodi microbiologici (MB)

VERAMENTE POCCHI CENNI SULLE INTOSSICAZIONI

Rossi – capitolo 13

Si definisce **tossica** qualunque sostanza estranea, d'origine minerale, vegetale o animale che, a contatto con organi e tessuti, sia in grado di provocare danni più o meno gravi sia alla struttura che alle funzioni organiche. Data l'elasticità della definizione non esistono, teoricamente, farmaci che non siano potenzialmente anche veleni. Sono definiti tali, tuttavia, quei farmaci che provocano danno o morte di un sano o di un ammalato anche a concentrazioni basse, così come tutti quei

farmaci che hanno una ristretta zona di maneggevolezza, o quei composti che a basse dosi esplicano effetti gravissimi.

I fattori che **influenzano** la tossicità di un farmaco sono i più svariati. Il principale è, indubbiamente, la **quantità**, così come la **forma chimica** d'assunzione. Più farmaci, inoltre, a parità di somministrazione per Kg di peso corporeo, possono risultare tossici quelli che sono legati a fenomeni di ipersensibilità, di tipo idiosincrasico o allergico, da parte del soggetto. Ancora, particolari condizioni fisiologiche possono risultare predisporre il soggetto ad azione tossica di un farmaco, come la **gravidanza** (purganti drastici che inducono il parto), stati di ipersensibilità, come le infiammazioni o le infezioni, che determinano alterazioni delle difese (lavande anestetiche in caso di cistiti). Per definire un farmaco "tossico" bisogna considerare, dunque, sia le sue proprietà, sia lo stato di salute del soggetto e le sue caratteristiche, ed ancora le interazioni ambientali. I fattori influenzanti l'attività tossica di un farmaco sono, dunque:

- Legati al tossico: le sue proprietà, la preparazione ecc...
 - Legati all'individuo: stato di salute, specie, razza, peso corporeo, sesso ecc...
 - Legato all'ambiente ed alle interazioni di questo con l'individuo, come la stagione, clima ecc...
- I tossici sono divisi in comunisti e fascisti... ☺, animali, vegetali, minerali, naturali e sintetici, organici ed inorganici.

Le **intossicazioni** sono divise in intenzionali o accidentali, queste ultime divise in: accidentali propriamente dette, alimentari, medicamentose, professionali.

Antidotismo e terapia tossicologica

Il trattamento delle intossicazioni prevede tre punti cardine:

- Ristabilire le funzioni vitali con tutti i mezzi possibili.
- Impedire, con antidoti esterni, che il tossico raggiunga il sangue, nel caso che questi non sia stato ancora del tutto contaminato.
- Facilitare, con antidoti interni, l'eliminazione del tossico, se questi si trovi già nei tessuti.

L'antidotismo è un fenomeno biologico che consiste in una interazione chimica, fisica o fisico-chimica tra due farmaci presenti in un organismo vivente. Pertanto, in base a quanto detto sopra, gli antidoti **esterni** reagiscono con il tossico rendendolo insolubile o non diffusibile, quindi non assorbibile, o trasformandolo in un prodotto assorbibile ma non tossico, mentre gli antidoti **interni** tendono ad annullare l'attività o impedire le manifestazioni dannose indotte dal tossico quando questo sia già stato assorbito. Risulta ovvio che si possono sempre mettere in pratica tutte quelle procedure tipiche come il lavaggio, bendaggio, tagli ecc... utili nell'eliminazione del tossico.

Antidoti esterni

Divisi in chimici, fisici o chimico-fisici. Nel caso in cui il tossico sia stato assorbito per **via orale**, bisogna effettuare l'allontanamento con lavanda gastrica, emetici o purganti. La **lavanda gastrica** agisce entro 3 ore e non è consigliata negli intossicati in coma o in preda a convulsioni – bisogna sempre stare attenti a non introdurre antidoti che producono CO₂ in pazienti a rischio per ulcere varie. L'induzione del **vomito** è controindicato in caso di ingestione di veleni corrosivi che possono creare danno al resto, o in caso comatoso o stuporoso; si preferisce, inoltre, l'intubazione tracheale. I **purganti** agiscono facilitando il transito intestinale del tenue e del crasso. La loro azione è efficace nel giro di un paio d'ore. Sono divisi in purganti saliti (stimolazione della secrezione), purganti oleosi (irritazione e attivazione peristalsi) e purganti glucoresinoidi (tutti e tre i meccanismi).

Antidoti interni

Gli antidoti interni sono **chimici** (chelanti e reagenti), **fisico-chimici** (adsorbenti o leganti) e **biologici**. A questi si possono sempre aggiungere i **diluenti**, i **metabolizzanti**, gli **escretori** del tossico. Le metodiche principali sono:

- Plasmaferesi.
- Dialisi extracorporea / peritoneale.

- Emodialisi lipidica.
- Emoperfusione su colonna di carbone.
- Exsanguinotrasfusione.
- Ossigenoterapia iperbarica.

Nel caso di manifestazioni d'intossicazione si deve procedere, ovviamente, alla somministrazione di sostanze che possano **antagonizzare** gli effetti negativi del tossico, in grado di opporsi ad esso agendo sulla periferia recettoriale. Questi farmaci devono poter:

- Antagonizzare l'occupazione recettoriale.
- Competere con l'occupazione recettoriale.
- Inibire la sintesi o liberazione dei mediatori prodotti dai tossici.
- Bloccare il metabolismo del tossico.
- Tamponare gli squilibri acido-base ed elettrolitici provocati dal tossico.
- Stimolare il recettore antagonista del sistema stimolato dal tossico.

Le manifestazioni tossiche di tipo biochimico-morfologico vanno trattate con farmaci preventivi e curativi.