

# FARMACOLOGIA MOLECOLARE

## ASSORBIMENTO:

- coeff. Di ripartizione LIPIDI/H<sub>2</sub>O
- liposolubilità
- superficie
- [concentrazione]
- pH → - F acido ha alta capacità ma bassa affinità
  - F basico ha alta affinità ma bassa capacità
  - F acido → pH acido ION/NON ION = 0.01 (lume)
  - pH basico ION/NON ION = 25.000 (plasma)

## BIOEQUIVALENZA:

- F che hanno uguale cinetica

## BIODISPONIBILITA':

- dal sito di somministrazione al sito di azione

## DISTRIBUZIONE:

- 3 compartimenti → ematico (3-4%, pH 7.4, litri = 3); extracellulare (15%, pH 7.4, litri = 9); intracellulare (30-40%, pH 7, litri = 30)
- I 3 compartimenti sono l'insieme di organi che trattano il farmaco allo stesso modo
- Vd = (quantità F somministrata)/([plasmatici] misurata)
- TRAPPING → accumulo (equilibrio secondo gradiente); sequestro (non equilibrio); tesaurisinosi (equilibrio in tempi lunghi)
- Legame con proteine (albumina)
- Barriere

## METABOLISMO:

- rende + idrofile le sostanze e ne facilita l'eliminazione
- reazione FASE 1 → redox; idrolisi; idratazione; isomerizzazione; acetilazione
- reazione FASE 2 → coniugazione
- P<sub>450</sub> → sistema microsomiale epatico ubiquitario; inibito da C=O; avvengono reazioni di redox, coniugazione, ac. Glicuronico.

## ELIMINAZIONE:

- rene, fegato
- cinetica di 1° ordine → X-10% = Y-10% = Z-10%....
- cinetica di 0° ordine → eliminazione quantità costante
- CLEARANCE: è un volume ed è uguale a Kc-Vd
- Circolo enteroepatico: la flora intestinale con coniugazione permette il riassorbimento del farmaco.

## RECETTORI:

- F lega R e altera la funzione
- Binding

## DOWN REGULATION→

- desensitizzazione
- omologa: diminuisce solo il segnale del R stimolato
- eterologa: recettori per diversi ligandi diminuiscono tutti per stimolo di uno solo

UP REGULATION: fenomeno inverso al precedente

## AFFINITA':

- potenza  $R + X \leftrightarrow RX$      $K_a = [RX]/[R][X] = \text{affinità}$
- $1/K_d$  (pendenza)

## Bmax:

- densità dei siti (intercetta)
- numero massimo di ligandi che lega / cellula

## LIGANDO e R:

- complementari
- la specificità dipende dalla []

## DOSE-EFFETTO / DOSE-LEGAME

AGONISTA PURO: effetto massimo, non diminuito da antagonista competitivo

AGONISTA PARZIALE: effetto massimo diminuito da agonista competitivo

AGONISTA INVERSO: segnale opposto all'agonista puro

ANTAGONISTA PURO: non attiva il segnale

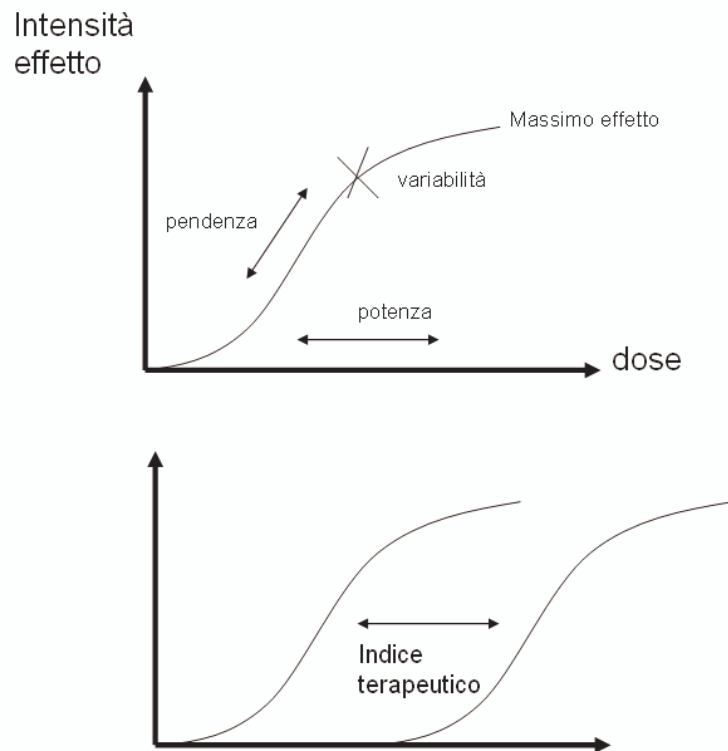
- REVERSIBILE: aumentando l'agonista lo si supera (= effetto massimo)
- IRREVERSIBILE: non lo si supera e l'effetto massimo cala
- COMPETITIVO: superato aumentando agonista puro
- NON COMPETITIVO: non superabile anche aumentando agonista puro

AGONISTA ANTAGONISTA: su 2 recettori diversi

## EFFETTO DOSE-RISPOSTA:

- pendenza→ maneggevolezza del farmaco e n° di R usati per ottenere l'effetto
- posizione→ potenza del F
- plateau→ effetto massimo, non correlato alla potenza
- variabilità→ dipende dal F e dall'individuo
- $ED_{50}$ → dose efficace 50%    (IN VIVO)
- $DL_{50}$ → dose letale 50%    (IN VIVO)
- $TD_{50}$ → dose tossica 50%    (IN VIVO)
- $EC_{50}$ → [] efficace 50 %    (IN VITRO)
- $CL_{50}$ → [] letale 50%    (IN VITRO)
- $TC_{50}$ → [] tossica 50%    (IN VITRO)
- INDICE TERAPEUTICO =  $TD_{50}/ED_{50} = TC_{50}/EC_{50}$ ; più è piccolo e più è tossico
- Iperreattività→ effetto a dose inefficace
- Iporeattività→ nessun effetto a dosi alte
- Ipersensibilità→ allergia

- Idiosincrasia → effetti rari
- Tolleranza → la risposta a dosi successive dello stesso F diminuisce ma viene ripristinata aumentando la dose
- Tachifilassi → come sopra (tolleranza) ma non può essere ripristinata aumentando la dose



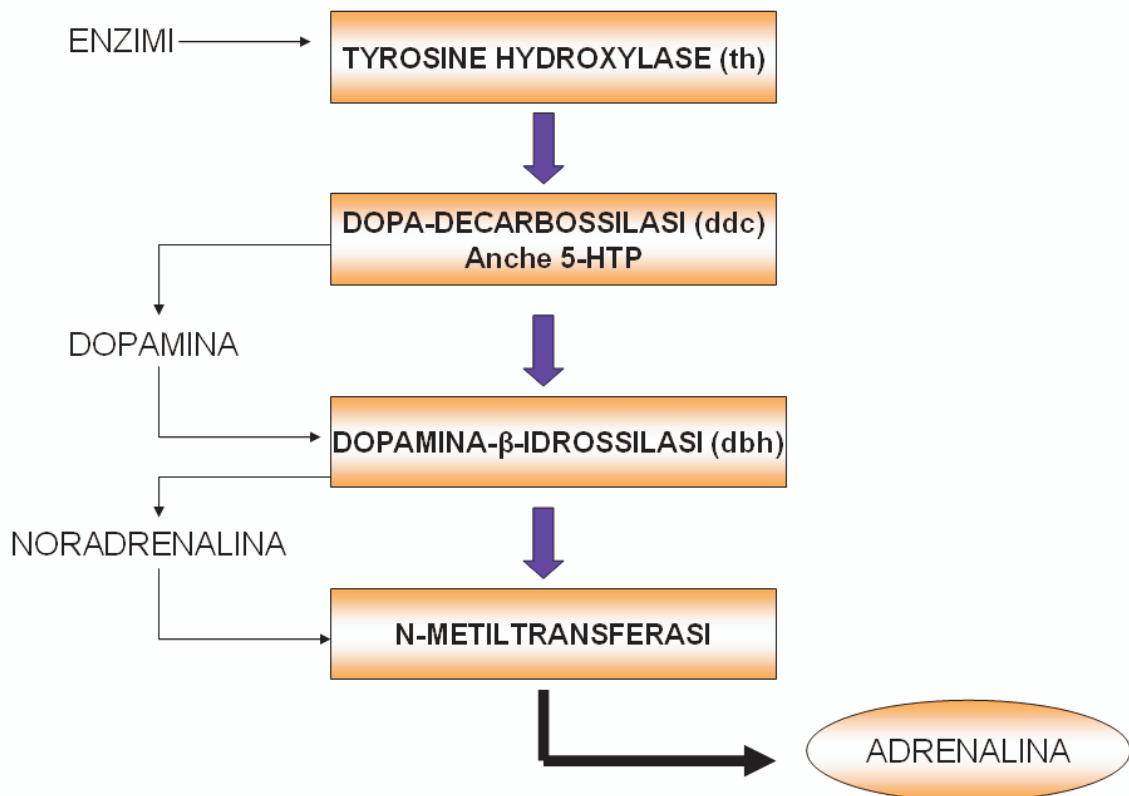
#### NEUROTRASMETTITORI:

- in base al recettore → ionotropi; metabotropi
- in base alla chimica → aminoacidi; ammine; peptici
- in base alle funzioni → neuro-trasmittitori/ormoni/modulatori/mediatori

#### CATECOLAMINE:

- DOPAMINA (DA)
- NORADRENALINA (NA)
- ADRENALINA (A)

Sintesi di A:



Metabolismo di A:

- se aumenta ma concentrazione di  $Ca^{++}$  → release
- OUABAINA → blocca la ricaptazione

Catabolismo delle CATECOLAMINE:

MAO:

- enzimi mitocondriali pre- e post-sinaptici
- intervengono nel metabolismo delle catecolamine
- MAO<sub>A</sub> → (5-HT) soprattutto in neuroni catecolaminergici; agenti bloccanti sono il Toloxolone e Broforamina
- MAO<sub>B</sub> → (DA, NA) in neuroni serotoninergici; agenti bloccanti sono la Selegina (deprenyl)

COMT:

- enzimi post-sinaptici → O-metilazione delle catecolamine
- agenti bloccanti sono il Talcopone

PATOLOGIE:

- Parkinson → perdita cellule della *substantia nigra* (DA) → rigidità, prevalenza Ach
- Corea di H. → maggior DA nello striatale
- Discinesia tardiva → aumentano i recettori DA
- Memoria → migliorata da β-agonisti

DOPAMINA (DA)

RECETTORI:

- D<sub>1</sub> → nigra, accumbens, amigdala

- D<sub>2</sub> → striato, chemocettore, glomi carotidei
- D<sub>3</sub>; D<sub>4</sub>; D<sub>5</sub>

#### FARMACOLOGIA (DA):

- tossici → 6-OHDA e MPTP

#### PRECURSORI:

- L-DOPA (influenza anche 5-htp); cibi con aa, fattori che influenzano ABS (assorbimento)

#### INIBITORI:

- della TH → α-MPT
- DCC: carbidopa

#### FALSI TRASMETTITORI → α-metilDOPA

#### BLOCCANTI CATABOLISMO:

- anti MAO<sub>B</sub>: selegina (deprenyl)
- anti COMT: talcopone

#### AGONISTI:

- diretti → apomorfina
- indiretti → amfetamina

#### ANTAGONISTI:

- D<sub>2</sub> > D<sub>1</sub> → tioxantine; fenotiazine
- D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>/D<sub>4</sub> → clazopina
- Usati come antipsicotici

INIBITORI STORAGE: reserpina → non captazione in granuli

BLOCCO RICAPTAZIONE: benzotropina, amfetamina, cocaina

#### NORADRENALINA (NA)

#### RECETTORI:

- α<sub>1</sub> → vasi cerebrali
- α<sub>2</sub> → tronco cerebrale (veglia, sedazione)
- β<sub>1</sub> → cuore, rene (maggior contrazione, ritmo cardiaco)
- β<sub>2</sub> → cervelletto, corteccia, bronchi

#### FARMACOLOGIA:

- tossici: 6-OHDA
- precursori: L-DOPA; DOPS → decarbossilato a NA
- inibitori: blocco aspecifico di TH e DDC; blocco specifico di DOPA-β-idrossilasi; Disulfiram
- falsi trasmettitori: α-metilDOPA
- inibitori storage: reserpina
- liberatori NA: amfetamina, cocaina
- inibitori catabolismo: anti MAO<sub>A</sub> → toloxatone, moclobemide; anti COMT → Talcopone
- bloccanti ricaptazione: antidepressivi triciclici (amine 2°)

#### AGONISTI:

- clonidina  $\alpha_2$
- dobutamina  $\beta_1$
- terbutalina  $\beta_2$

#### ANTAGONISTI:

- prazosin  $\alpha_1$
- yohimibina  $\alpha_2$
- timalolo  $\beta_1$

#### CATECOLAMINE (seconda parte)

- stimolazione muscolatura liscia, vasale e ghiandolare
- inibizione muscolatura liscia, bronchiale, intestinale
- eccitazione cardiaca
- aumento di acidi grassi
- effetti endocrini
- regolazione cibo, stimolo respiro e attività motoria (SNC)
- effetti presimpatici di stimolo e inibizione

#### AGONISTI:

- diretti  $\rightarrow$  mantengono l'effetto dopo denervazione
- indiretti  $\rightarrow$  perdono o diminuiscono l'effetto dopo denervazione

#### FALSI TRASMETTITORI $\rightarrow$ effetti minori dei trasmettitori originali

#### RECETTORI:

##### RECETTORI $\alpha$ :

- $\alpha_1 \rightarrow$  vasocostrizione, midriasi, aumento pressione sanguigna
- $\alpha_2 \rightarrow$  inibizione liberazione NA, presinaptici
- cute, costringe muscolo
- antagonista  $\rightarrow$  ergotamina

##### RECETTORI $\beta$ :

- $\beta_1 \rightarrow$  tachicardia, aumento contrattilità miocardia, sul cuore
- $\beta_2 \rightarrow$  vasodilatazione, broncodilatazione, rilassamento muscolatura liscia utero
- antagonista  $\rightarrow$  isoproterenolo

#### ADRENALINA (A)

- $\alpha$  e  $\beta$
- stimolo aumenta la pressione arteriosa, aumenta frequenza, vasocostrizione
- anti  $\alpha \rightarrow$  tutto scende
- anti  $\beta \rightarrow$  tutto sale
- aumento renina ( $\beta_1$ )
- stimolo cuore ( $\beta_1$ )
- rilascia i bronchi ( $\beta$ )
- aumenta glucosio, diminuisce insulina ( $\alpha_2$ ) e  $>$  insulina ( $\beta_2$ ), aumenta glucagone
- midriasi

#### NORADRENALINA (NA)

- trasmettitore post-ganglionico
- identico ad adrenalina per effetti su recettori  $\beta_1$ , mentre differisce per  $\alpha / \beta_2$

- aumenta la pressione arteriosa perché è vasocostrittore
- metabolismo come A

#### DOPAMINA (DA)

- a basse [ ] → agisce su  $D_1$  e dilata
- ad alte [ ] → agisce su  $\beta_1$  e aumenta la pressione arteriosa
- ad altissime [ ] → agisce su  $\alpha_1$  e crea vasocostrizione

#### BETA-AGONISTI:

- in broncocostrizione e scompenso
- adrenalina, efedrina
- isoprotenerolo → agonista  $\beta_1/\beta_2$ , poco  $\alpha$  (asma); diminuisce resistenze periferiche vascolari e aumenta la gittata; rilascia tutti i muscoli lisci

#### BETA-2 AGONISTI ( $\beta_2$ ):

- va bene in asma
- albuterolo (resistente a COMT); formoterolo
- possono stimolare cuore, tremori muscolari, tachicardia

#### BETA-ANTAGONISTI:

- propranololo:  $\beta_1/\beta_2$ ; in ipertensione e aritmia
- labetalolo:  $\alpha$  e  $\beta$  antagonista; peggiora l'asma

#### BETA-1 ANTAGONISTI ( $\beta_1$ ):

- cardioselettivi
- atenololo, acebutolo (antiipertensivi): peggiorano scompensi, asma con attenzione

#### ALFA-1 AGONISTI ( $\alpha_1$ ):

- muscolatura liscia
- metossamina, fenilefrina (contrazione arteriosa), metildopa

#### ALFA-2 AGONISTI ( $\alpha_2$ )

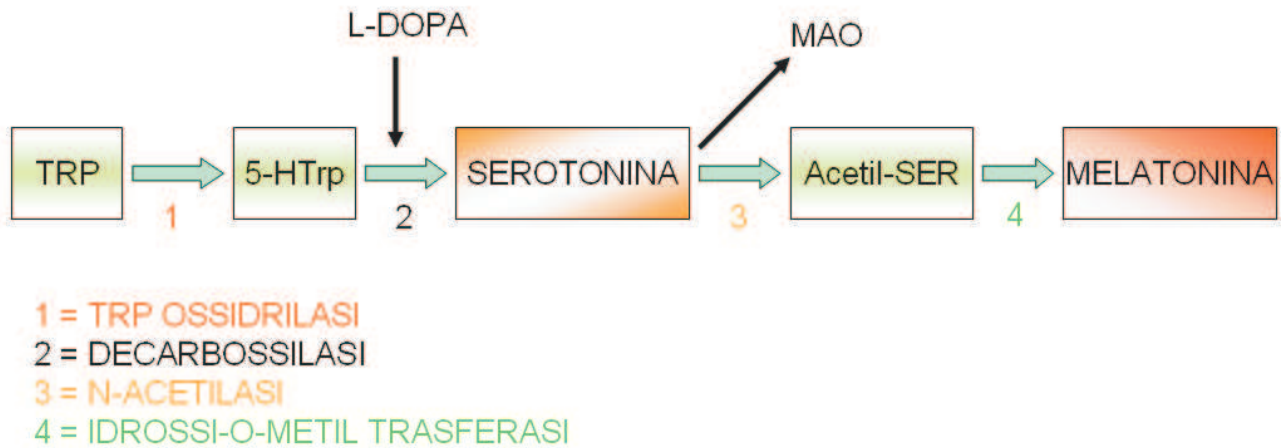
- clonidina (antiipertensivo)
- $\alpha$ metilNA: falso antiipertensivo

#### ALFA-ANTAGONISTI ( $\alpha$ ):

- anti  $\alpha_1$  → vasodilatano
- anti  $\alpha_2$  → liberano NA e Ach
- blocco  $\alpha_1$  nel cuore → diminuisce la pressione arteriosa e blocca la vasocostrizione
- blocco  $\alpha_2$  nel cuore → aumenta NA liberata dalle presinapsi
- prazosin:  $\alpha_1$  specifico
- usati in ipertensione, scompenso, ipertrofia prostatica

## SEROTONINA (5-HT):

- sintesi:



## RECETTORI:

- 5-HT<sub>1</sub>: sistema limbico e midollo
- 5-HT<sub>1-A</sub>: ippocampo, amigdala, cibo, memoria, aggressività, depressione
- 5-HT<sub>1-B</sub>: striato
- 5-HT<sub>1-C</sub>: nigra, ipotalamo, diminuisce locomozione e cibo
- 5-HT<sub>1-D</sub>: surrenali
- 5-HT<sub>2</sub>: post-sinaptici, lega NA, Ach, DA, 5-HT; situati in corteccia frontale, ippocampo; schizofrenia
- 5-HT<sub>3</sub>: canale ionico, rapida depolarizzazione, antiemetici
- 5-HT<sub>4</sub>: cavie e topo

FISIOLOGIA: modula sonno, cibo, dolore, aggressività, sesso, ansia

## FARMACOLOGIA:

- tossici → 5,6-DHT e 5,7-DHT che ledono i neuroni
- inibitori sintesi → PCPA (inibitore TRP-OH), carbidopa (inibitore decarbossilasi)
- inibitori catabolismo → anti MAO<sub>A</sub> sono il toloxatone, brofaromina
- inibitori ricaptazione → imipramina, antidepressivi
- bloccanti storage → reserpina
- AGONISTI → m-CCP, sumatriptan
- ANTAGONISTI → ansiolitici, antipsicotici, antiemetici, metergolina

## MELATONINA:

- diminuisce con la luce
- regola ritmi circadiani
- sintesi nella ghiandola pineale



## IPERTENSIONE:

### FARMACOLOGIA→

- diuretici: ritengono il Na e diminuiscono il volume ma poi si torna allo stato iniziale
- bloccanti gangliari: bloccano i recettori nicotinici
- bloccanti neuroni catecolaminergici
- reserpina
- vasodilatatori
- agonisti  $\alpha_2$  centrali
- antagonisti  $\alpha_1$  periferici
- $\beta$ -bocanti
- bloccanti canale  $Ca^{++}$
- bloccante ACE: blocco bradichinica e angiotensina-1→2

## PARKINSON:

- alterazione del controllo del movimento
- degenerazione della sostanza nigra
- *L-DOPA*
- Carenza 80-90% di DA, coinvolge recettori  $D_1$  e  $D_2$
- Posso bloccare l'Ach (acetilcolina)

Meccanismo d'azione→aumento DA e aumento effetto su  $D_2$

- effetti collaterali: fenomeni "ON-OFF"→improvvisa non risposta alla terapia; fenomeni "FINE DOSE"→verso fine terapia inizia il tremore

*L-DOPA + carbidopa:*

- raggiunge meglio il cervello
- inibizione DDC→potenziamento COMT; *3-O-metilDOPA*→compete per il passaggio della BEE
- *L-DOPA + carbidopa*(blocca AAAD) + *talcapone*(blocca COMT)→ *L-DOPA* al cervello
- inibitori MAO<sub>B</sub>

AGONISTI dopaminergici: *bromocriptina*→antagonista  $D_1/D_2$  usata in ON-OFF

ANTICOLINERGICI→antimuscarinici

ANTIISTAMINICI→effetto antimuscarinico

GABA:

- modula attività dopaminergica a livello della sostanza nigra
- *benzodiazepine* sono gabaergici

## COREA DI HUNTINGTON:

- operatività DAergica
- GABA e Ach
- Deplezione catecolaminergica con reserpina

## NEUROLETTICI:

- per la schizofrenia

FARMACI:

- antidopaminergici  $D_2$
- migliorare il rapporto con la realtà
- *clozapina*→può presentare sintomi Parkinson-simili
- aspecifici

FARMACOCINETICA:

- legati a proteine

- coniugati a livello epatico
- scelta del F per tentativi
- sicurezza alta (da soli)
- passano la barriera placentare e possono trovarsi nel latte materno

#### EFFETTI COLLATERALI:

- endocrini, neurologici (sedazione, stanchezza)
- ipotensione, ittero
- discrasie ematiche, dermatiti
- discinesia tardiva (rigidità muscolare nei movimenti) dovuti agli antiDOPA
- antiemetici
- eucinetici
- sedativi

#### INFIAMMAZIONE:

- risposta spontanea aspecifica (innata)
- risposta immunitaria specifica
- calore, dolore, rossore, alterazione funzione
- dilatazione arteriale → aumenta capillarità venule post-capillari (edema)
- componente umorale e cellulare → cellule polimorfonucleate e mononucleate migrano al sito d'inflammatione

#### 3 FASI:

A) acuta transitoria → vasodilatazione (COX1 > COX2)

B) tardiva → leucociti e fagociti

C) cronica proliferativi → degenerazione e fibrosi (COX2 > COX1)

Le PG (ProstaGlandine) aumentano l'inflammatione → uso F che bloccano PG

MEDIATORI dell'INFIAMMAZIONE: istamina, bradichinica, citochine

#### FARMACI ANTIINFIAMMATORI:

##### FANS:

- interferiscono con il catabolismo dell'acido arachidonico
- antinfiammatori
- antipiretici
- analgesici (anti COX1)

Occorre ottenere acido arachidonico dai lipidi di membrana.

STEROIDI → blocco della fosfatidilserina

##### MECCANISMO D'AZIONE:

- blocco delle COX
- blocco sintesi PGG<sub>2</sub>
- blocco attività perossidasi
- prevenzione malattie cardiovascolari
- potenzia i LEUCOTRIENI (rischioso con l'asma)

COX-1 → sempre presenti

COX-2 → inducibile da citochine

Se prendo un anti-COX1 (*aspirina*) e poi un anti-COX2 (*aulin*) → peggioramento

INIBITORI COX-2 vanno bene insieme alle terapie per:

- neoplasie
- neurodegenerative
- iperalgesia
- infezioni CHV

Causano però altri effetti quali:

- vasocostrizione renale

- blocco produzione muco gastrico
- blocco aggregazione piastrinica

#### PARACETAMOLO:

- analgesico
- antipiretico
- agisce centralmente
- rapidamente ossidato

#### METABOLISMO DEI FARMACI:

##### ELIMINAZIONE:

- lipofilo → idrofilo
- escrezione (urinaria, biliare, respiratoria, fecale, traspirazione)
- processo contrario all'assorbimento
- BIOTRASFORMAZIONE → F da lipofilo ad idrofilo tramite enzimi metabolici

##### METABOLISMO:

- la [F] vicino al R = INFLUSSO (assorbimento e distribuzione) – EFFLUSSO (metabolismo, escrezione)
- F liposolubile entra nella cellule → enzimi → trasformazione; eccezione per la *suramina* (antitripanosoma) rimane in circolo per 2-3 mesi
- Origine a metaboliti poco attivi e facilmente escretabili
- Origine a metaboliti più attivi o tossici (eroina → morfina; metabolica ossidato del paracetamolo)
- BIATTIVAZIONE dei profarmaci (L-DOPA → dopamina)

##### SITI ANATOMICI:

- determinati dalla distribuzione del F nel corpo
- organi specializzati come FEGATO (effetto di 1° passaggio), polmoni, placenta, flora intestinale

##### FEGATO:

- passa il sangue refluo
- sistema enzimatico: citocromo P<sub>450</sub> → complesso enzimatico nei MICROSOMI (artefatti)
- MICROSOMI: ruvidi (costituiti da RER) e lisci (REL, GOLGI, mitocondri, membrana cellulare). Sono di natura lipoproteica e quelli lisci sono il sito di biotrasformazione; qui i F lipofili diventano idrosolubili mentre quelli meno lipofili vengono metabolizzati da enzimi citoplasmatici

##### CITOCROMO P<sub>450</sub>:

- gruppo prostetico Fe<sup>+2</sup> (red) ↔ Fe<sup>+3</sup> (ox)
- ubiquitario
- un F: R-H → R-OH (più idrofilo e escretabile)
- il Fe media il ciclo di ossidoriduzione e delle 2 molecole di O<sub>2</sub> introdotte, una esce con H<sub>2</sub>O e una è introdotta nel F
- isoenzimi

#### BIOTRASFORMAZIONI

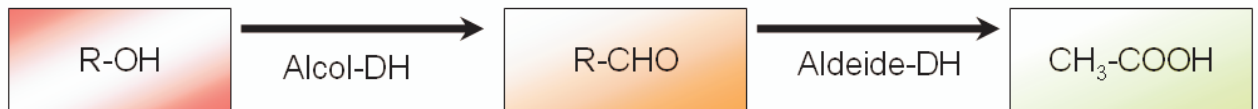
- reazioni enzimatiche
- FASE-1 → non sintetiche o di funzionalizzazione
- FASE-2 → sintetiche o di coniugazione

##### REAZIONI NON SINTETICHE (FASE-1):

- modificazione porzione essenziale della molecola
- ossidazioni, riduzioni, idrolisi
- possono essere mitocondriali (non microsomiali)
- microsomiali → enzimi per il trasporto di elettroni o enzimi associati al RE

OSSIDAZIONE di molecola da parte del citP<sub>450</sub>

- O<sub>2</sub>; NADPH e suo enzima; citP<sub>450</sub>
- Esiste un P<sub>450</sub> extraepatico
- Ossidasi citosoliche → nella porzione solubile del fegato, reni, polmoni
- Ossidazione di alcoli e aldeidi:



- Ossidazioni delle purine
- Ossidazioni mitocondriali (nei mitocondri) → deaminazione ossidativi (MAO per le catecolamine endogene)

RIDUZIONI e IDROLISI

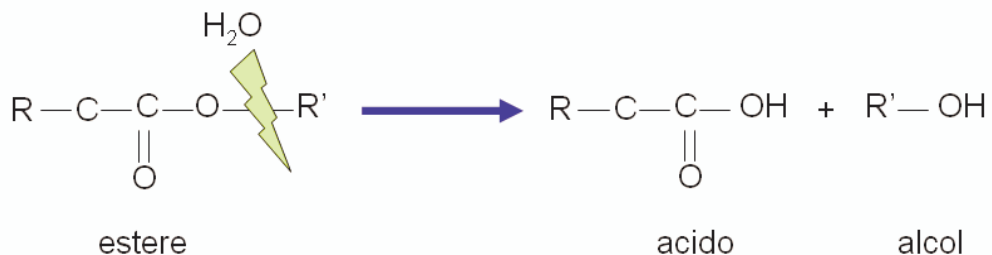
- inibite da O<sub>2</sub>
- NADPH
- Enzimi microsomiali e non-microsomiali
- Azotoriduzioni:



- Nitroriduzioni:



- IDROLISI → esterasi plasmatiche: acetilcolina → colina + acido acetico



- Queste reazioni diminuiscono dimensione della molecola e donano gruppi funzionali (OH, NH<sub>2</sub>, COOH) per la successiva FASE-2

REAZIONI DI FASE 1
RIDUZIONE
S-DEALCHILAZIONE
DEAMINAZIONE
SULFOSSIDAZIONE
N-OSSIDAZIONE
DESOLFURAZIONE
EPOSSIDAZIONE

#### REAZIONI SINTETICHE:

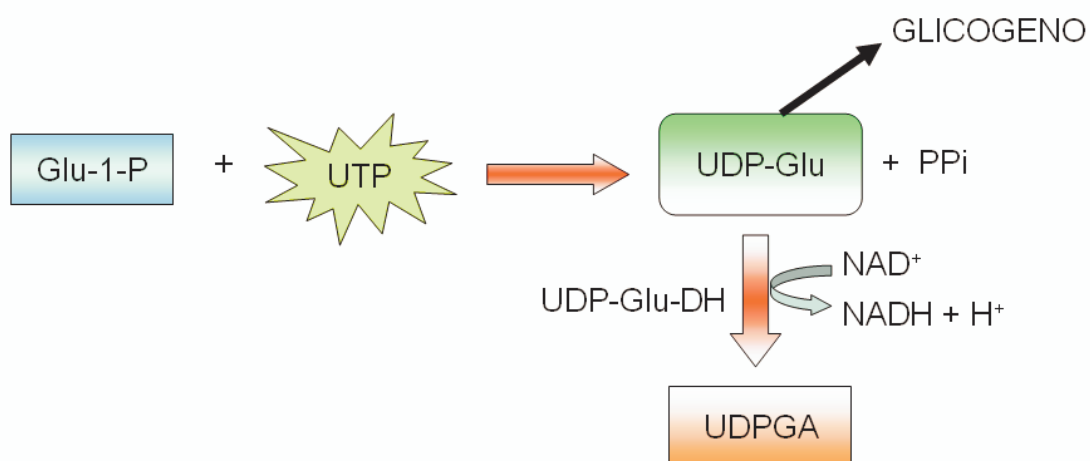
- rendono il F più idrosolubile

#### CONIUGAZIONI:

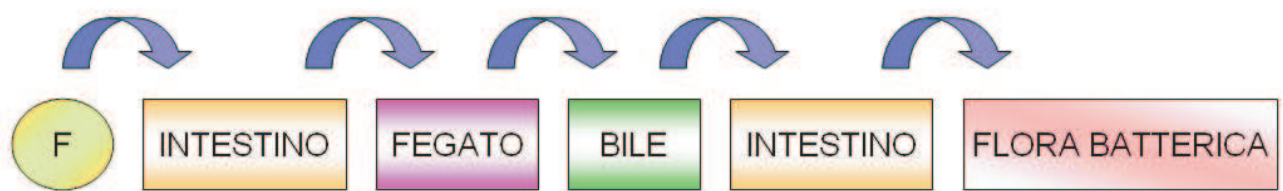
- composto legato a molecola endogena → coniugato:
- più solubile in acqua
- più ionizzato
- passaggio difficoltoso tra membrane
- sono reazioni microsomiali e non-microsomiali
- **TRANSFERASI**
- Occorre energia per attivare cofattori intermedi ad alta energia
- Legami covalenti

#### GLUCURONAZIONE:

- reazione microsomale
- substrati su cui agiscono questi enzimi sono (alcoli, fenoli, acidi carbossilici, amine, tioli, sulfonamidi)
- elevato numero di cofattori coinvolti
- acido uridindifosfoglicuronic
- enzima: UDPGA-TRANSFERASI
- forte idrofilicità alla molecola per la presenza di numerosi -OH
- UDPGA → metabolismo sintesi glicogeno
- Se l'organismo necessita di glicogeno, la glucuronazione è sfavorita



- I prodotti della glucuronazione → substrato per le β-glucuronidasi nella flora intestinale



#### SULFATAZIONI:

- cofattore → PAPS = 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosolfato
- enzima: sulfotransferasi

#### METILAZIONI:

- diminuisce la idrosolubilità

#### ACETILAZIONI:

- cofattore → AcetilCoA
- acetil-derivati meno idrosolubili dei F originali
- sulfamidici → precipitano nei tubuli renali → danno renale

#### CONIUGAZIONE CON AA:

- glutatione (antiossidante, tripeptide gly-glu-cys), protettivo; in citosol e microsomi
- glicina
- glutammica (uomo)
- ornitina (uccelli)
- formazione acido mercapturico

#### FATTORI CHE INFLUENZANO IL METABOLISMO:

- età
- dieta
- fumo
- malattie
- farmaci (interazioni)
- T corporea

#### ETA':

- capacità metabolizzante bassa in vecchiaia e nascita (diversa attività metabolica e quantità)
- neonato possiede 5% del P<sub>450</sub> dell'adulto
- Hb fetale → bilirubina (fotosensibile) → kernittero
- Poca coniugazione / glucuronazione
- Cloramfenicolo → sindrome del "bambino grigio"

#### DIFFERENZA TRA SPECIE:

- metabolismo ossidativi dell'esobarbital varia da specie a specie (uomo < cane)
- imipramina (antidepressivo) → agisce demetilato → OK nel ratto ma NO nel coniglio
- glucuronazione deficitaria nel gatto
- differenze dovuta a velocità e tipo di vie metaboliche
- utilizzare modelli che dal punto di vista biotrasformativo siano più simili al target biologico

#### DIFFERENZE INTRASPECIFICHE – FATTORI GENETICI:

- polimorfismo
- rispetto allo stesso dosaggio si possono avere reazioni diverse
- acetilazioni veloci o lente → dosi diverse
- diversa glucuronazione tra razza bianca e gialla per il paracetamolo

#### DIETA:

- mancanza di minerali (Ca, Cu, Fe, Zn) → minor efficienza ossidativi

- mancanza di vitamine (C, E, complesso B) → minor velocità di biotrasformazione
- presenza di sostanze non-nutrienti (composti indolici, rottura aa) → aumento P<sub>450</sub>1A
- TEMPERATURA CORPOREA:
- - se alta → aumenta metabolizzazione → stati febbrili

#### ORMONI – SESSO

- femmine di ratto: metabolizzano più lentamente dei maschi per cui occorre diminuire la dose dei barbiturici

#### FATTORI GENETICI:

- colinesterasi plasmatiche: degradazione succinilcolina
- N-acetil transferasi: coniugazione isoniazide

#### FATTORI PATOLOGICI:

- cirrosi
- epatite
- epatoma
- diminuiscono capacità di metabolizzare del fegato

#### FUMO:

- contiene benzopirene
- fumo da tabacco → prodotti di pirolisi
- fumo di vegetali → induttori del metabolismo, della biotrasformazione (idrocarburi policiclici)

#### FATTORI AMBIENTALI:

- metalli pesanti (Pb, Hg, Cd)
- inquinanti industriali
- possono essere sia induttori che inibitori.

FARMACI → stimolare o inibire il metabolismo di se stessi e altri F con medesime vie metaboliche

#### STIMOLANTI:

- barbiturici
- fnilidantaine
- mepobromato
- alcool
- cloroformio
- tranquillanti
- additivi
- insetticidi
- aumentano attività enzimatica e la quantità di enzimi
- l'induzione è reversibile (finisce interrompendo l'assunzione del F)
- induzione di P<sub>450</sub> e altri enzimi e sintesi proteica (inibitori sintesi proteica bloccano questa induzione)
- l'aumento di metabolismo si ha per tutti i F che attraversano una precisa via metabolica
- barbiturici → tolleranza metabolica: somministrando la stessa dose nel tempo diminuisce l'effetto, il F viene sempre più metabolizzato e allontanato
- sostanze cancerogene sono: TCDD (TetraCloroparaDibenzoDiossina), benzopirene, 3-metilcalantrene
- a livello citoplasmatico: proteina recettore → trasloca nel nucleo → trascrizione geni P<sub>450</sub>
- barbiturici modulano attività trascrizionale, aumentano la produzione di mRNA ed enzimi microsomiali
- etanolo e composti a basso peso molecolare → rallentano turn-over degli enzimi (che permangono più a lungo nella cellula)

## INIBITORI:

- per avere + a lungo il F
- SKF525A (proadifen) inibisce molte reazioni catalizzate dal P<sub>450</sub>
- Il legame è reversibile
- Proadifen + barbiturici (esobarbital) → prolungamento azione ipnotica
- Prevenzione epatotossicità dovuta a metaboliti tossici di un F

## ELIMINAZIONE

### VIE DI ESCREZIONE:

- movimento retrogrado → F dai tessuti → circolo → organi/tessuti che separano ambiente interno-esterno
- renale
- epatica-intestinale
- polmonare
- cutaneo-mucosa
- ghiandola mammaria

### RENE:

- 1) arterie ampie e brevi con elevata pressione idrostatica (è vicino al cuore)
  - 2) arterie piccole
  - 3) arteriose afferenti (capsula di Bowmann)
  - 4) capillari glomerulari: endotelio con larghi pori per passaggio sostanze grazie a pressione idrostatica
  - 5) dai capillari glomerulari → ultrafiltrato: rapido movimento plasma → capsula
- flusso ematico elevato: 1.3 litri/min; 25% gittata cardiaca → 20% ultrafiltrato a livello glomerulare e di questo 20%, 150 litri/gg di volume plasmatici e di questi 150 litri, 130 ml/min
  - assorbe l'acqua
  - F se in forma libera → ultrafiltrato → incanalato nel tubulo prossimale
  - F se carico NON viene riassorbito → no-passaggio retrogrado → facilmente eliminabili
  - F se NON carico e LIPOFILO → riassorbito

### TUBULO DISTALE:

- F liofilo → viene riassorbito
- F idrofilo → probabilmente riassorbito
- F carico → non viene riassorbito

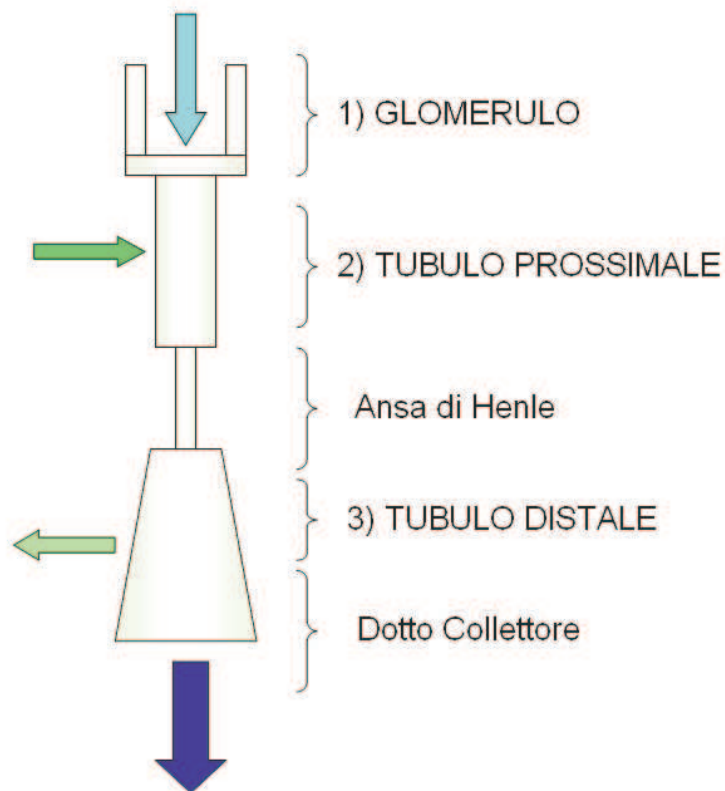
### TUBULO PROSSIMALE:

- F liofilo → viene riassorbito
- F idrofilo → probabilmente riassorbito
- F carico → non viene riassorbito

### ANSA DI HENLE

- no riassorbimento di acqua né di F





- 1) il F libero entra nel filtrato glomerulare
- 2) secrezione attiva (acidi + basi deboli); i sistemi di trasporto (uno per il F basico ed uno per il F acido) hanno bassa specificità; i carriers possono trasportare sia composti endogeni che F → competizione (probenecid VS penicillina: il primo si lega al trasportatore e la penicillina permane + a lungo)
- 3) riassorbimento passivo del F non ionizzato e liposolubile
  - nel passaggio tubulare → 99% dell'acqua è riassorbita e F si concentra: se è liofilo viene riassorbito mentre se è idrofilo viene escreto
  - via via che si forma urina → acidificazione (ph = 5-6.5)
  - F acidi deboli (barbiturici) nella forma indissociata vengono riassorbiti
  - Se si basificano le urine con bicarbonato → escrezione
  - Urina contiene F ionizzato non liposolubile (non riassorbito)

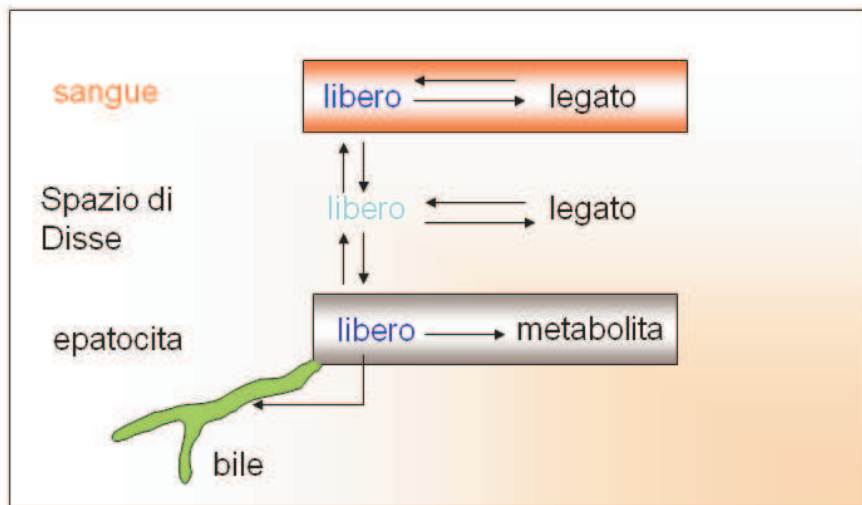
F può essere:

- filtrato
- filtrato e parzialmente riassorbito
- attivamente secreto nei tubuli

**ESCREZIONE = (FILTRAZIONE + SECREZIONE) – (RIASSORBIMENTO)**

ESCREZIONE EPATICA:

## FEGATO



Secrezione biliare → 4 sistemi di trasporto:

- per sostanze neutre
- per anioni
- per acidi biliari
- per cationi

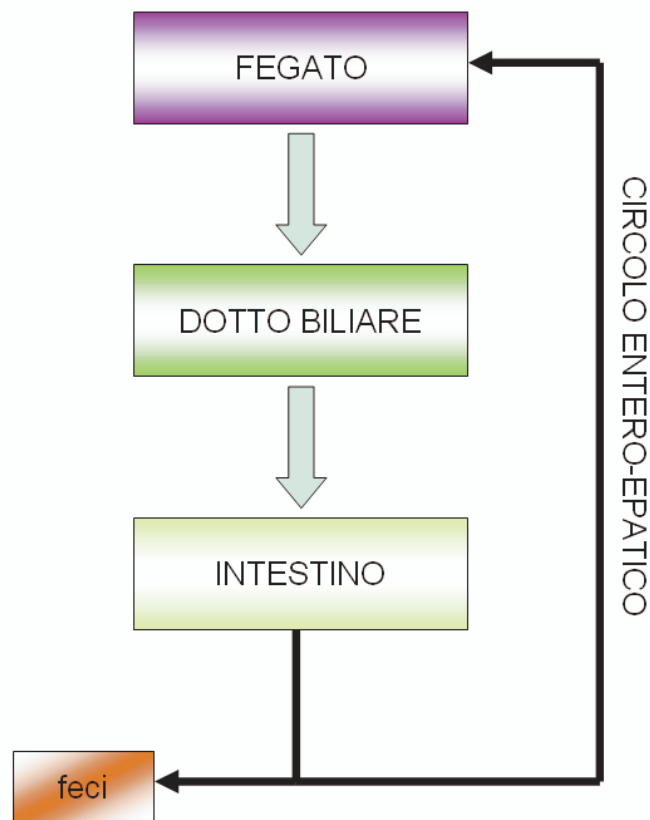
Un litro di bile al giorno è:

- metabolizzata dalla flora intestinale
- riassorbita
- eliminata con le feci

ALTRE VIE DI ESCREZIONE:

1) BILIARE

- 1 litro/gg
- Fegato elimina sostanze con peso molecolare minore di 300Da
- Glucuronazione facilita escrezione



- 2) POLMONARE: sostanze gassose e liquidi volatili
- 3) CUTANEA: traspirazione → quote modeste di F
- 4) LATTE
  - diffusione semplice della forma non carica
  - pH più acido del sangue per cui i F basici sono ionizzati ed escreti

#### ESCREZIONE ATTRAVERSO RENE:

- nefrone: unità funzionale
- corteccia
- midollare
- VOLEMIA → mantenere costante il volume del sangue
- Regola gradiente di pressione osmotica tra sangue e tessuti
- Aggiusta la [ ] assoluta e relativa dei costituenti plasmatici

#### NEFRONE:

- unità funzionale costituita da tubuli e capillari
- dei 150 litri/gg che passano nel rene → 1.5 litri: urina/gg
- 1.000.000/rene
- Epitelio monostratificato

#### FUNZIONAMENTO:

- filtrazione poco selettiva di grossi volumi di plasma
- riassorbimento più selettivo del 99% di acqua filtrata e parte dei soluti
- secrezione attiva tubulare di acidi e basi dal plasma al lume tubulare
- a livello della capsula di Bowman si forma l'ultrafiltrato ed i metaboliti e F fuoriescono
- ultrafiltrazione glomerulare (molecole < 50kDa) → non passano proteine e F legati ad esse
- diffusione passiva secondo gradiente → tubulo prossimale e distale (F lipofilo riassorbito)

- trasporto con carriers → per sostanze acide (penicillina, aspirina, sostanze glucuronate) e per sostanze basiche (istamina, serotonina)

## FARMACOCINETICA

FARMACO → sostanza biologicamente attiva e deve raggiungere il sito d'azione

Il F a livello ematico va incontro a:

- assorbimento
- distribuzione
- metabolismo
- eliminazione

FASI DI AZIONE: applicazione → biodisponibilità(A) DME → farmacodinamica → effetto

Vie di SOMMINISTRAZIONE:

- entrale
- parenterale
- varia

## ASSORBIMENTO

- F solido → (K<sub>i</sub>) → F soluzione
- Forma farmaceutica

Membrane biologiche:

- pKa; lipofilia
- diffusione passiva
- diffusione acquosa
- diffusione facilitata
- trasporto attivo
- endocitosi
- modulato da cibi
- ionizzazione importante nella somministrazione gastrointestinale (cibi, farmaci, patologie)
- nella somministrazione per OS → EFFETTO DI 1° PASSAGGIO: F nel circolo enteroepatico dove viene metabolizzato e/o escreto per via biliare
- effetto finale dell'assorbimento è l'arrivo al SANGUE ad una [ ] che varia nel tempo (D,M,E)
- nel sangue F è presente come F libero (D,M,E); F legato a proteine plasmatiche; F legato a cellule circolanti
- la [F] libero è condizionata da altri F

## DISTRIBUZIONE:

- trasferimento reversibile del F dal sangue ai vari distretti nell'organismo (BIOFASE)
- H<sub>2</sub>O corporea: plasmatici, interstiziale, intracellulare
- Per fusione sanguigna
- Età, salute, obesità

Vi sono diversi modelli per descrivere questo processo →

- 1) Modello aperto ad 1 compartimento: plasma e tessuti sono un unico compartimento e l'equilibrio è raggiunto presto
- 2) Modello aperto a 2 compartimenti: distribuzione lenta che caratterizza in modo diverso i 2 compartimenti
- 3) Modello aperto a 3 compartimenti: ci sono almeno 2 compartimenti tissutali

Dalle curve di concentrazione ematica → parametri essenziali:

- $t_{1/2}$  → la concentrazione si riduce della metà a distribuzione completa
- **AUC** → quantità di F (Q); misura la biodisponibilità
- **Vd** → volume di liquidi biologici necessario a contenere il F nella stessa concentrazione plasmatici
- **Cl<sub>t</sub>** → quota di Vd liberata dal F nell'unità di tempo
- **Vd = Q/Cp** → Vd < 20 litri: interstiziale; Vd > 40 litri: anche nei tessuti

#### BARRIERE BIOLOGICHE:

- placentare → attraversata da quasi tutti i F
- BEE (barriera ematoencefalica) → quantitativamente superiore: P<sub>170</sub> (proteine di trasporto)

La distribuzione concorre anche ad una ridistribuzione (F nel tessuto adiposo).

#### METABOLISMO:

- eventi che rendono il F più eliminabile
- trasformazioni
- enzimi (reazioni) di FASE 1 (trasformazione, redox, idrolisi) e di FASE 2 (coniugazione)
- ridotta la lipofilia
- dipende da: specie, età, sesso, altri F, genetica
- F che spiazzano un altro F dalle proteine plasmatiche → metabolismo ed escrezione di quest'ultimo
- Tossificazione
- Trasformazioni metaboliche → enzimi microsomiali: CITOCROMO P<sub>450</sub>  
 $R-H + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow R-OH + NADP^+ + H_2O$
- Fase di coniugazione, glucuronica:  $UDPGA + R-X-H \leftrightarrow R-X-GA + UDP$

PROFARMACO: derivato di un principio attivo che tramite meccanismi metabolici → ripristino del principio attivo dopo A e/o D. Serve per superare i problemi di tossicità.

FARMACO RITARDO: modificazione reattività del F per prostrarre la sua permanenza.

#### ESCREZIONE:

- renale: FILTRAZIONE (glomerulo) → SECREZIONE TUBULARE (secrete con trasporto attivo sostanze anioniche e cationiche) → RIASSORBIMENTO TUBULARE (diffusione passiva); tanto più F è lipofilo e più viene riassorbito; **clearance**: = 120 ml/min → ultrafiltrato (escreta è riassorbita), > 120 ml/min → secreto (la parte riassorbita è < di quella escreta), < 120 ml/min → riassorbito (la parte escreta è < di quella riassorbita).
- biliare: F con P.M. > 400-600 kDa secreto dal fegato va nella bile sotto forma di acidi biliari
- polmonare: eliminati gli anestetici

#### TRASMISSIONE COLINERGICA:

- Ach (Acetilcolina): SINTESI → enzima: COLINOACETILTRANSFERASI  
 METABOLISMO → enzima: AchESTERASI → idrolizza Ach in Colina e acido acetico
- Globulare: G<sub>1</sub> – G<sub>2</sub> – G<sub>4</sub>; code idrofobe per aderire alla membrana
- Asimmetrica: A<sub>4</sub> – A<sub>8</sub> – A<sub>12</sub>; coda collagene-like

#### EFFETTI:

- stimolazione gangli autonomi e muscoli volontari
- secrezione A (adrenalina) dal surrene
- aumenta salivazione
- bradicardia
- stimola liberazione N=O → vasodilatazione

#### RECETTORI NICOTINICI:

- nel SNP, nella giunzione neuromuscolare
- nel SNC, nelle sinapsi gangliari
- subunità  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$

#### RECETTORI MUSCARINICI:

- $M_1$  → azione eccitatoria e si trovano nell'SNC, neuroni periferici e cellule parietali dello stomaco
- $M_2$  → effetto inibitorio ed aumentano la permeabilità al  $K^+$  e si trovano nel cuore, nelle terminazioni presinaptiche dei neuroni periferici e centrali
- $M_3$  → effetto eccitatorio, rilasciano la muscolatura liscia per liberare N=O dalle cellule endoteliali e si trovano nelle ghiandole salivari, bronchioli, e ghiandole sudoripare

#### AGONISTI MUSCARINICI:

- Ach
- *Carbacolo* (meno suscettibili a idrolisi)
- *Metacolina* (subito idrolizzata)
- *Pilocarpina* ( $M_3$ )

#### ANTAGONISTI MUSCARINICI

- aboliscono effetti stimolazione parasimpatico
- *atropina* (lipofila)
- *ioscina* (lipofila)
- *omatropina* (lipofila)
- *ipratropio* → via inalatoria → broncodilatazione

#### TRASMISSIONE NORADRENERGICA:

##### RECETTORI:

$\alpha_1$

- accoppiati a PL-C e svolgono la loro azione grazie al rilascio di  $Ca^{++}$  intracellulare
- vasocostrizione
- rilasciamento muscolatura liscia intestinale
- secrezione salivare
- glicogenolisi epatica

$\alpha_2$

- accoppiati negativamente all'Adenilato Ciclasi;  $< cAMP$
- sugli epatociti, piastrine, muscolatura vasale, neuroni SNC, presinapsi
- inibizione rilascio mediatori (NA, Ach)
- inibizione aggregazione piastrinica
- vasocostrizione

$\beta_1$

- stimolano Adenilato Ciclasi
- a livello cardiaco
- effetto IONOTROPO e CRONOTROPO positivo dovuto alle catecolamine

$\beta_2$

- associate all'Adenilato Ciclasi
- rilasciamento muscolatura liscia (come  $\alpha_1$ )
- broncodilatazione
- glicogenolisi epatica (come  $\alpha_1$ )
- tremore muscolare

$\beta_3$

- associati all'Adenilato Ciclasi
- cellule adipose
- lipolisi

NA (noradrenalina) → neuromodulazione: agisce su recettori presinaptici → modula suo stesso rilascio

#### CATECOLAMINE:

- ricaptate dalla terminazione noradrenergica o da cellule adiacenti
- catecolamine circolanti sono degradate da enzimi

#### UPTAKE-1 →

- livello neuronale
- consentito dalla presenza di un sistema ad alta affinità con velocità massima di trasporto bassa
- selettivo per NA

#### UPTAKE-2 →

- captazione extraneuronale
- bassa affinità per NA ma alta Vmax di trasporto

#### DEGRADAZIONE:

##### MAO:

- monoaminoossidasi
- all'interno delle cellule e sulla superficie mitocondriale
- catecolamine → aldeidi → degradate da aldeidi-deidrogenasi

##### COMT:

- catecol-O-metil-transferasi
- neuroni e in cellule non neuronali

#### AGONISTI ADRENERGICI:

- *Adrenalina*
- *Noradrenalina*
- *Salbutamolo*

#### ANTAGONISTI ADRENERGICI:

- *Doxazosina* ( $\alpha_1$  selettivo)
- *Fenossibenzamina* ( $\alpha$  non selettivo)
- *Idazosano* ( $\alpha_2$  selettivo)
- *Propranololo* ( $\beta - \beta_2$  selettivo)

#### INIBITORI SINTESI NA:

- *Metildopa*

#### AMINE SIMPATICOMIMETICHE:

- *Efedrina*
- *Amfetamina*

#### INIBIZIONE REUPTAKE NA:

- Antidepressivi Triciclici

#### ANTIINFIAMMATORI

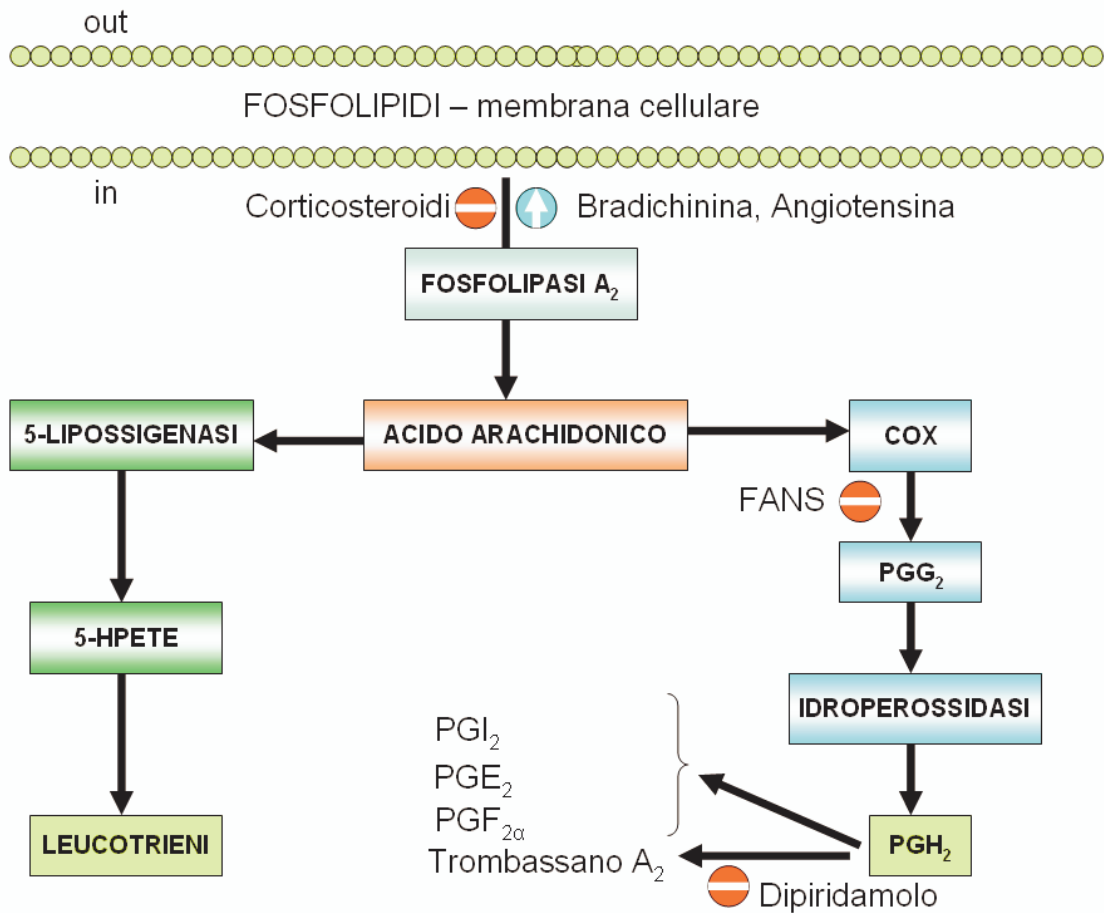
FANS: Farmaci Antinfiammatori non steroidei

- antinfiammatori
- analgesici
- antipiretici
- inibizione COX (ciclo ossigenasi) dell'acido ARACHIDONICO → inibizione PG (prostaglandine) e TA (trombassani)
- COX-1 → costitutiva, trasmette segnale cellula-cellula (inibizione causa effetti collaterali)
- COX-2 → induttiva, stimolata da cellula infiammata, produce PROSTANOIDI, mediatori infiammazione. Inibizione causa azione antinfiammatoria)

F SELETTIVI COX-1 → *indometacina*

F SELETTIVI COX-2 → *BF-389*

F SELETTIVI COX-1/2 → *aspirina, piroxicam, ibuprofene, diclofenac, naproxene, nabumetone*



ENZIMI → siti di bersaglio per i F

1) normalmente il F è un substrato analogo che agisce come inibitore competitivo

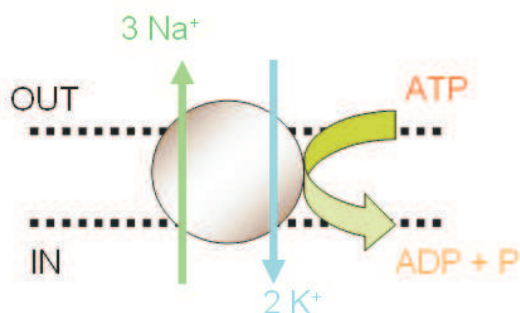
2) F agisce come falso substrato

Occorre però:

- correlazione tra entità inibizione enzimatica ed effetto farmacologico
- inibizione in vitro e in vivo
- correlazione tra dose F, effetto, inibizione enzimatica

POMPA Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi DIPENDENTE:

I F glucosidi cardioattivi agiscono su tale meccanismo per la cura di insufficienza cardiaca





Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>:

- controlla il volume cellulare
- mantiene il gradiente sodio/potassio
- nelle cellule eccitabili è implicata nella conduzione dell'impulso
- pompa ATPasica
- 3 Na<sup>+</sup> esterne e 2 K<sup>+</sup> interne → omeostasi cellulare
- Distribuzione asimmetrica della pompa nelle cellule epiteliali
- Distribuzione simmetrica in cellule non-epiteliali
- Antiporto
- Regola indirettamente lo scambiatore Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup>

Diverse isoforme:

- α<sub>1</sub> → ubiquitaria; renale
- α<sub>2</sub> → muscolo (scheletrico e cardiaco)
- α<sub>3</sub> → nel SNC (presenti però tutte e tre le forme)

GLICOSIDI CARDIOATTIVI:

- digitatici o cardiosteroidi (ouabaina)
- si legano alla pompa sodio/potassio impedendone il funzionamento
- derivazione vegetale contenenti zuccheri (glucosidi) legati ad anello steroideo
- aumenta forza contrazione cuore (INOTROPO positivo)
- aumenta Ca<sup>++</sup> intracellulare, inibizione Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi, effetto INOTROPO positivo

CONTRAZIONE MIOCITA: stimoli → apertura canali Na<sup>+</sup> → Na<sup>+</sup> in cellula → apertura canali Ca<sup>+2</sup> di tipo L → contrazione → promuove liberazione Ca<sup>+2</sup> → contrazione.

Nel plasma umano ci sono fattori endogeni simili ai digitatici:

- 2 simili alla OUABAINA e DIGOSSINA prodotti dalla midollare del surrene
- 1 fattore ipotalamico

Aldosterone, corticosterone → espressione genica pompa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi

EGF, vasopressina, glucagone → modificazione post-trascrizionale con secondo messaggero → aumenta il numero di pompe presenti e aumenta il turn-over.

POMPA PROTONICA GASTRICA:

- H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi
- Determina secrezione di H<sup>+</sup>
- INIBITORI → F antiulcera (omoprazolo): si lega irreversibilmente sulla subunità catalitica

RESISTENZA MULTIFARMACOLOGICA:

Gene MDR1 codifica per una P-glicoproteina →

- abbondante nei tumori
- trasportatore che riduce influsso di F e ne aumenta l'efflusso.

PURIFICAZIONE E ISOLAMENTO DI RECETTORI:

occorre:

- 1) organo ricco di R (organo elettrico Torpedo con R per Ach simile all'uomo)
- 2) composto che si leghi irreversibilmente

Se [R] è bassa → studi di binding su **struttura-attività** ma non sulla tridimensionalità

TESSUTO BIOLOGICO →

- solubilizzazione: detergente simile a colesterolo
- purificazione: cromatografia
- determinazione struttura: elettroforesi (SDS)

Per trovare la struttura 1° e 3° → BIOLOGIA MOLECOLARE: si parte dal DNA della proteina

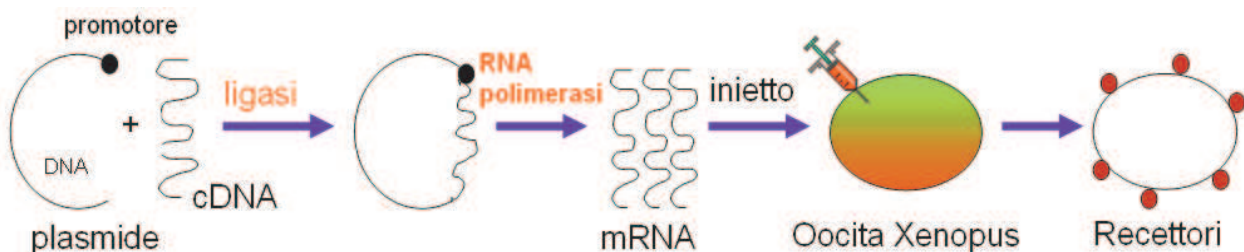
Per risalire al gene della mia proteina → CLONAGGIO dei R: cDNA library e SCREENING cDNA di interesse.

ESECUZIONE:

- 1) OMOGENATO → centrifugazione → pellet contenente mRNA
- 2) mRNA + TRASCRIPTASI INVERSA → elica di DNA complementare all'mRNA; separo la catena di DNA e aggiungo DNA POLIMERASI → cDNA a d.s. (double strand)
- 3) cDNA in vettori plasmidici, tagliando con enzimi di restrizione e saldando con DNA LIGASI
- 4) selezione del clone ricombinante su terreni selettivi: inserisco cDNA in mezzo ad un gene che dà resistenza ad un antibiotico (ricordo che nel vettore plasmidico ci sono 2 geni per resistenze ad antibiotici) → mescolo i plasmidi con *E. coli* → mezzo di coltura + *Ampicillina* → mezzo di coltura + *Tetraciclina*. Se i batteri non crescono su di uno, allora sono ricombinanti in quanto uno dei due cDNA è andato ad inserirsi al posto di un gene della resistenza
- 5) con la riproduzione di *E. coli* → CLONE (libreria di cDNA)
- 6) SCREENING LIBRERIA in due modi:
  - **tramite Ab** → per riconoscere un clone che fabbrica *insulina*, uso Ab (anticorpi) che riconoscono questa molecola e sono fissati su una piastra di plastica. La metto in contatto con un gruppo di cloni. La piastra con molecole di insulina attaccate su, viene appoggiata su un'altra piastra con Ab "etichettati" con ISOTOPO\* (radioattivo) e anche essi si attaccano all'INSULINA. La piastra con Ab-insulina-Ab\* → autoradiografia e dalla posizione risalgo al clone di origine.
  - **tramite oligonucleotidi** → Petri con più cloni: le cellule vengono "rotte" e il DNA denaturato → aggiungo sonda-RNA\* (radioattiva, 10-15 aa) → appaiamento al filamento di DNA con sequenza complementare → IBRIDO RNA-DNA e con autoradiografia identifico la colonia col mio cDNA. Per avere ulteriore conferma, se ho clonato con oligonucleotidi eseguo il riconoscimento proteina con Ab. Per conoscere la struttura 1° della proteina → PROFILI DI IDROFOBICITA' (in membrana)

**OBIETTIVI RAGGIUNTI:**

- clonazione R umani per neurotrasmettitori
- trasfezione lievito
- studio di vari sottotipi di R
- conoscenza dei siti funzionali tramite mutazioni puntiformi
- produrre Ab contro proteina (Ab monoclonali)
- delucidazione traduzione
- mancano informazioni sulla 3D (tridimensionalità)



**AB MONOCLONALI** → Ab selettivi contro una ben definita parte di R

Antigene (con determinanti antigenici) + linfociti B → PLASMACELLULE → Ab nel siero contro i determinanti antigenici. Mi occorrono Ab monoclonali in grado di riconoscere un solo determinante antigenico.

**PRODUZIONE AB MONOCLONALI:**

- determinanti antigenici iniettati in topo → IMMUNIZZAZIONE
- fusione tra cellule di MIELOMA (pure) e linfociti B (siero policlonale) del topo
- formazione di IBRIDOMI e cellule non fuse
- distinzione IBRIDOMA da MIELOMA → diversa capacità metabolica
- terreno selettivo con AMINOPTERINA (blocca *diidrofolato redattasi* che consente la sintesi di purine e pirimidine da composti semplici) → sopravvivono solo le cellule che hanno la 2° via metabolica ( *timidina kinasi e ipoxantina fosforibosiltransferasi* partendo da timidina e ipoxantina e non è presente nel mieloma)
- solo gli IBRIDOMI sopravvivono
- diluizione limite → cellule singole in coltura
- cloni che ne derivano → Ab con UNICA SPECIFICITA'

**DINAMICA DEI RECETTORI:**

Il R è un'entità dinamica.

Individuazione di PIT (invaginazioni di membrana) e vescicole libere nel citoplasma e sono COATED e appaiono dense al microscopio → queste strutture sono legate all'internalizzazione di materiale extracellulare.

**DOWN REGULATION:**

**ENDOCITOSI** →

- processo in cui la cellula internalizza costituenti extracellulari
- fagocitosi / pinocitosi
- aspecifica: in base alla [ ] del mezzo extracellulare
- specificata: o mediata da R, la cellula può internalizzare il 50% della sua superficie

**ENDOCITOSI MEDIATA DA RECETTORI:**

- ingresso in cellula di nutrienti e molecole
- ingresso di EGF o INSULINA → down regulation → internalizzazione R; meccanismo di controllo del segnale; trasporto a livello del sito d'azione
- R → degradato; resintetizzato; riesposto
- fenomeni di desensibilizzazione a diversi agonisti
- presentazione di Ag (antigeni)

**COATED VESICLES:**

- diversi destini e origini cellulari e diversi ruoli:
- endocitosi
- trasporti vari; di orfanelli contenenti DR (DRUG-RECEPTOR ovvero Farmaco legato a Recettore)
- limitazione stimolo prodotto da DR
- trasporto nel nucleo di materiale biologico
- esocitosi
- riciclaggio componenti di membrana

Prerequisito per i processi di internalizzazione → BINDING di materiale extracellulare al R

FARMACOLOGIA: coated pits & vescicles → evidenza istologica di strutture capaci di internalizzare R, DR, D

**RECETTORI DI MEMBRANA:**

- medium dinamico

- interazione ligando-R → formazione di un CLUSTER di DR (no energia) → aggregati più grossi → migrazione del complesso DR di qualche μm (CAPPING, occorre energia) → reclutamento e rivestimento di CLATRINA nella parte citoplasmatica → formazione rivestimento → internalizzazione coated-pits a dare le coated-vescicles → clatrina riutilizzata.

#### CLATRINA:

- **triskelion** (3 catene pesanti 180 kDa più 3 catene leggere 35 kDa) → 640 kDa
- 36 triskelion → rete di 12 pentagoni e 8 esagoni → canestro poliedrico
- Proteine accessorie: tubulina e glicoproteina
- Si lega alla vescicola con legami deboli
- Adaptor Proteins (AP) associate alla clatrina e fanno in modo che le vescicole siano rivestite da clatrina correttamente

#### ENDOCITOSI MEDIATA DA RECETTORI:

- 1) ligando internalizzato → confinato nel sistema endo-lisosomiale mentre il R ricicla in membrana: LDL → LDL che trasporta il colesterolo viene degradato
- 2) sia R che ligando → superficie: TRANSFERRINA-Receptor → (degradato solo il R e non la transferrina che trasporta il Ferro). APOFERRINA → transferrina senza Fe.
- 3) R e ligando → degradati a livello lisosomiale: EGF-Receptor
- 4) TRANSCITOSI: R e L (L = ligando) esposti sul lato opposto della membrana cellulare.

#### INTERNALIZZAZIONE:

R non cambia

R incrementa

R decrementa

#### DOWN-REGULATION →

- TACHIFILASSI: la cellula non risponde a stimoli che arrivano in breve tempo
- TOLLERANZA: la cellula non risponde a stimoli che gli arrivano ma si verifica in tempi più lunghi
- DESENSIBILIZZAZIONE (Down regulation, tachifilassi, tolleranza)

#### RECETTORI INDUCIBILI:

- condizioni patologiche o fisiologiche → induzione trascrizionale
- UP-REGULATION: aumento espressione funzionale di R preesistenti

#### INDUZIONE:

- transiente, mantenuta dallo stimolo
- de novo R per nuove risposte
- condizioni fisiologiche → angiogenesi; manipolazioni ormonali
- Condizioni patologiche → infiammazione; EGF; infezioni virali

#### NF-κB:

- attivazione importante per molti R inducibili
- attivazione può avvenire tramite RAS/RAF
- tessuto-specificità
- rimodellamento cellulare → regolazione temporanea sensibilità cellula

#### CAVEOLAE:

- invaginazioni di 50-100 nm che sono un'appendice della membrana plasmatica
  - **caveolina**: proteina integrale di membrana (20 – 22 kDa)
  - tante caveoline adiacenti → CAVEOLAE
  - caveolina + lipidi
- 2 stadi di sepf-associazione →

- 1) oligomerizzazione → da monomeri a dimeri → HMN oligomero
- 2) interazione oligomero-oligomero → CAVEOLAE

4 tipi di caveoline:

- 1) CAV 1 $\alpha$  → muscolo liscio, adipociti
- 2) CAV 1 $\beta$  → muscolo liscio, adipociti
- 3) CAV 2 → adipociti
- 4) CAV 3 → muscolo scheletrico e cardiaco

Regione precisa che media interazione:

- CAV-CAV: citoplasmic region 41 aa (61-101)
- CAV-PROTEINS: COOH-terminal 20 aa (82-101) → SCAFFOLDING DOMAIN

RUOLO:

- funzione nell'endocitosi R-dipendente
- POTOCITOSI: piccole molecole che devono entrare in cellula
- TRASCITOSI
- Immagazzinamento di molecole segnale o substrati enzimatici
- Traduzione segnale → molti R risiedono in caveolae
- Polarità cellulare
- Alterazione caveolae → patologie

CAVEOLINE BINDING MOTIF → nelle G $\alpha$  e nel dominio chinasi di molte PK (fosfochinasi)

Complessi oligomerici legati alla membrana che contengono elementi del citoscheletro e molecole segnale.

#### FARMACI ANTIGENE E ANTISENSENZA

- modificano la produzione di una proteina
- si legano a siti specifici degli acidi nucleici (DNA – RNA)
- target recettoriale nucleare
- ODN → oligodeossinucleotidi: non modificano il genoma

#### OLIGONUCLEOTIDI ANTISENSENZA →

- piccole sequenze DNA/RNA con basi complementari ad uno specifico gene o mRNA
- bloccare la produzione di proteina virale
- formazione DUPLEX RNA-OLIGONU → NO-TRADUZIONE
- formazione TRIPLEX DNA-OLIGONU → NO-TRASCRIZIONE

#### VANTAGGI ODN:

- inibire 1 gene → inibire migliaia di copie di proteina
- semplicità progettazione chimica
- indice terapeutico favorevole; specificità interazione e minor effetti collaterali

#### SVANTAGGI ODN:

- scarsa stabilità chimica nei liquidi biologici
- no specifici sistemi di trasporto attraverso barriere
- alti costi di sintesi

#### SCELTA OLIGONU:

- lunghezza: 20-25 Nu → < 20 Nu → no riconoscimento; > 25 Nu → problemi di assorbimento
- selezionare anche OLIGO con errori
- rapporto CG/AT ≤ 50%
- controllare proteina target
- controllare eventuale tossicità
- utilizzare più antisense
- prove per verificare che l'antisense abbia funzionato (binding, western blot)

#### ENTRATA OLIGO IN CELLULA:

- hanno una carica negativa (-) su ogni gruppo P (fosfato) quindi per aumentare la stabilità occorre usare *metilfosfonati* (ma sono poco solubili) o *fosforotioati* (solubili)

- diffusione passiva secondo gradiente o per endocitosi specifica (Receptor Mediated Endocytosis) o aspecifica

#### TARGET:

- nucleare: (triplex) blocco trascrizione. Può legarsi alla regione di controllo impedendo il legame dell'RNA-Polimerasi o alla regione codificante spiazzando la RNA-Polimerasi
- citosolico: (duplex) blocco traduzione impedendo ai ribosomi di iniziare o completare la traduzione oppure tramite attivazione di un enzima ubiquitario (RNAasi-H) che idrolizza mRNA nel sito di legame col F

#### ANTISENSE OLIGO:

- triplex
- Lega mRNA nascente e previene traduzione
- Lega esone
- Lega esone-introne
- Lega mRNA e impedisce trasporto dal nucleo
- Lega mRNA 5'CAP; AUG

#### BIODISPONIBILITA' degli OLIGO è ridotta da:

- degradazione da nucleari
- legami a proteine
- legami a lipidi
- compartimentalizzazione in endosomi

Per ovviare al problema delle nucleari posso fare sostituzioni: *fosfoetiltriesteri* o *metilfosfonati*.

Per aumentare la biodisponibilità cellulare →

- ridurre legami aspecifici
- oligo più liofili (coniugato con colesterolo)
- oligo nei LIPOSOMI che proteggono dalla degradazione enzimatica e assicura un efflusso lento per molti giorni
- etichetta gli oligo verso le cellule con Ab

#### IAR: Intracellular-expressed Antisense RNA

- cellule trasformate ex-vivo con gene ricombinante → sintesi di RNA complementare
- antisense più lungo incrementando la possibilità di ibridazione
- superano i problemi legati alla penetrazione
- problemi di tossicità
- applicazione su HIV e CANCRO

#### ODN:

Effetto concentrazione dipendente

Effetto di un ODN confrontato con ODN simili a lunghezza e sequenza →

- SCRAMBLED SEQ: basi uguali ma ordine diverso
- MISMATCHED SEQ: solo alcune basi diverse
- ODN SENSE: stessa sequenza del messaggero

#### TOSSICITA' -MUTAGENICITA':

- 1) tossicità cellulare → interferenza con proteine cellulari
  - 2) tossicità sequenza dipendente → proteina non più prodotta: effetto farmacologico buono
  - 3) tossicità sequenza indipendente → legame ad altre proteine in maniera aspecifica
- ODN non sono mutageni.

FARMACOCINETICA degli ODN: tutti i tessuti escluso il cervello; si legano all'albumina; non sono tossici a lungo termine (febbre, ipotensione).

#### APPLICAZIONI CLINICHE:

- terapia antivirale
- terapia antitumorale
- neuroimmunologia

#### FARMACOLOGIA TRASCRIZIONE GENICA

I meccanismi molecolari che regolano l'espressione di una proteina → regolazione trascrizione relativo gene da parte di RNA-Polimerasi-2.

#### FORMAZIONE COMPLESSO DI INIZIO:

- alla TATA-box si legano fattori di trascrizione (D, B, F)
- successivamente si lega la POL-2 (assistita da diversi fattori: TF2D etc), E, H
- si legano poi gli ATTIVATORI in sequenze a monte della TAT-box
- GRE = glucocorticoid response elements
- CRE = cAMP response elements
- UPE = Up-stream promoter elements → sequenza DNA a cui si legano i fattori di TRASCRIZIONE

La funzione e l'espressione di molti attivatori è regolata da stimoli extracellulari quali stress, ormoni, stimoli ossidativi.

#### 3 CLASSI DI FATTORI DI TRASCRIZIONE:

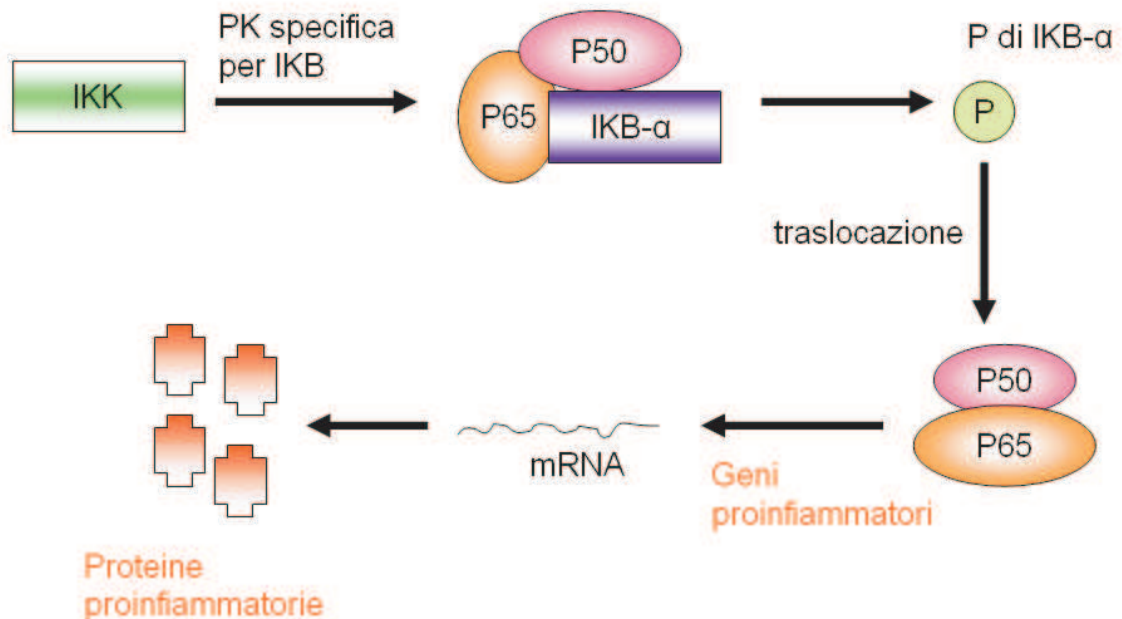
- 1) attivati da ligando, R per ormoni steroidei
- 2) attivati da modifiche post-trasduzionali: CREB, STAT, NF-kB → fosforilati da PKA, PKC, MAPK ma che a loro volta fosforilano
- 3) regolati a livello trascrizionale

#### REGOLAZIONE TRASCRIZIONE DA STIMOLI EXTRACELLULARI:

- **1° classe:** ormoni steroidei diffondono per lipofilia → citoplasma su R per ormoni steroidei → attivano trascrizione nucleare nel nucleo
- **2° classe:** segnali extracellulari → secondi messaggeri → kinasi → STAT entra nel nucleo o CREB è già nel nucleo → gene fattore trascrizionale (3° classe)
- **3° classe:** mRNA esce dal nucleo → proteina → nucleo per regolare trascrizione di altri geni

#### NF-kB:

- fattore di trascrizione e regolazione
- regola espressione catena K delle IgG nei linfociti B, è però ubiquitario
- espressione geni coinvolti nell'infiammazione
- stimoli extracellulari
- bersaglio per F antinfiammatori
- GLUCOCORTICOIDI → trascrizione IKB. R attivato dai glucocorticoidi → NF-kB-IKB → inattivazione
- ASPIRINA → inibisce dissociazione NF-kB-IKB



#### TERAPIA GENICA:

- introdurre uno o più geni nelle cellule somatiche di uno o più tessuti del paziente
- utile in malattie che arrecano deficit proteico, cancro, AIDS

##### 1) EX-VIVO:

- cellule prelevate da paziente, coltivate, inserito il gene e cellule reiniettate nell'uomo (cellule emopoietiche)
- VANTAGGI no risposta immunitaria
- SVANTAGGI: laboriosa

##### 2) IN VIVO:

- gene terapeutico inserito direttamente nelle cellule del paziente
- VANTAGGI: più semplice e utilizzabile su ampia scala
- SVANTAGGI: resa bassa per cellule che si dividono poco; difficile evitare che il gene non vada in altre cellule; vettore può scatenare risposta così come la proteina di interesse se non è mai stata prodotta dall'organismo

VETTORI → DNA normalmente non supera la membrana e comunque viene degradato o fagocitato MA il vettore può attivare un oncogene e causare neoplasie.

- VIRALI: capacità di penetrare in cellula (retrovirus, adenovirus, herpes virus) possibilità di risposte immune degradatoria
- RETROVIRALI: MMLV (virus leucemia murina di Maloney), il menoma virale è quasi totalmente deletato e dopo un po di tempo l'espressione si riduce p scomparire → metilazione. Problema della modulazione → troppa proteina è dannosa.
- ADENOVIRALI: si possono inserire DNA lunghi; infettano bene le cellule; non si integrano nel menoma della cellula tradotta; buoni se la terapia è transiente



- HERPES VIRUS e LENTIVIRUS: bene rispettivamente per SNC e AIDS ma hanno un'intrinseca patogenicità
- NON VIRALI: LIPOSOMI → fibrosi cistica in cui manca il gene per il trasporto del CF

Con la terapia genica oggi si curano alcune malattie:

- SCID (Sindrome Immunodeficienza Acquisita) dovuta a carenza di ADA (Adenosina deaminasi) → infusione di ADA nei liposomi
- DIABETE
- CANCRO → eliminare tutte le cellule cancerose; immunoterapia (cellule tradotte in vitro con plasmidi che codificano per Ag tumorali e reiniettate → reazione T-citotossica); strategia citotossica → cellule tumorali con geni suicidi
- Delle cellule GERMINALI → passa alle generazioni → etica.

## RECETTORI:

Molecola che lega in modo specifico, definito e con affinità precisa uno o più mediatori endogeni e da ciò → trasformazione conformazionale → effetto biologico

### 1) INTRACELLULARI:

- legano ormoni e mediatori lipofili → interagiscono col genoma modificando l'espressione
- legati ad HSP (Heat Shock Proteins) e quindi inattivati
- Responsive Elements → sequenze specifiche dei promotori

### 2) DI MEMBRANA:

- CANALI IONICI aperti da legame con neurotrasmettitori
- GPCR
- INTEGRINE di matrice extracellulare
- R per le CITOKINE
- R con attività fosforilasi intrinseca
- R con attività guanilatociclasica

Classificati in base al ligando e alla struttura.

## RECETTORI DI MEMBRANA:

### R CANALE (IONOTROPI):

- complessi macroproteici transmembrana → canale ionico
- attivati da neurotrasmettitore
- rapidi cambiamenti [ioni]
- R nicotinici, GABA, R-Gly, Ionotropi per il Glu, 5-HT<sub>3</sub> per serotonina, P<sub>2x</sub> per purine
- 4/5 subunità ognuna delle quali attraversa 4 volte la membrana M1-M4
- Canale limitato dalle porzioni M2
- Selettività data da aa carichi elettricamente disposti ad anello
- Sito di legame extracellulare su subunità  $\alpha$  e altre posizioni
- Siti allosterici → modificano attività del canale
- Siti di fosforilazione nella parte citoplasmatica
- Siti di legame proteine/citoscheletro
- F agisce su siti di legame dell'agonista, siti allosterici, nel lume
- RUOLO: trasmissione sinaptica veloce; diverse subunità per determinare canale ionico; apertura canale dopo legame col ligando (mSec)
- R canale → il F si lega → apertura
- R canale voltaggio dipendente → il F modula ma l'apertura →  $\Delta V$
- PATCH CLAMP: registrazione a tassello per studiare porzioni di membrana e registrare correnti che fluiscono attraverso canali ionici e classificarli.

### R METABOTROPI:

- accoppiati a G-proteine
- più numerosi
- GTP
- Cascata enzimatica di 2° messaggeri → effetto biologico
- F agisce su sito di legame dell'agonista; F agonisti e antagonisti; attivazione proteina G; produzione e distruzione 2° messaggeri

#### R ATTIVITA' TIROSINKINASICA INTRINSECA:

- R per molti fattori di crescita
- Una catena che attraversa una sola volta la membrana
- Autofosforilano → cascata di eventi
- Oncogeni → R per fattori di crescita che hanno perso la regolazione fisiologica
- F agisce solo su sito agonista

#### R CON ATTIVITA' GUANILATO CICLASICA:

- R per il peptide natriuretico
- Se alterati → neoplasie

#### MODULAZIONE RECETTORI:

- 1) a livello di produzione e degradazione del mediatore (feedback)
- 2) a livello di interazione mediatore-recettore; è reversibile e l'attività del R è controllata dalla  $K_D$  (modificata con fosforo dalla cellula)
- 3) a livello trasduzionale (desensitizzazione, down-regulation, up-regulation)
- 4) a livello di spegnimento del segnale generato dal R; attività di fosfatasi e fosfodiesterasi sono controllate dallo stesso 2° messaggero
- 5) a livello di induzione di R (*bradikina* nell'infiammazione)

#### R NICOTINICI-COLINERGICI:

- R-IONOFORI → legano Ach e aprono canale per il Na
- Espresso ad alta densità (10.000 molecole/ $\mu\text{m}^2$  nell'apice delle pieghe della membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare)
- 5 subunità glicoproteiche
- Parte extracellulare a forma di imbuto per raccolta ioni ed è presente il sito di legame per il neurotrasmettitore
- Estremità N e C terminali extracellulari
- Nell'attraversare la membrana il R si restringe → PORO selettivo per gli IONI
- Anelli carichi negativamente (-) per attrarre ioni positivi (+): in questa regione → PORTA che si apre con il legame Ach
- Nel citoplasma si riallarga il canale e sono presenti siti di fosforilazione e siti di legame con le proteine del citoscheletro (43kDa)
- 2 siti per Ach sulle subunità  $\alpha$  e interagiscono con COOPERAZIONE POSITIVA
- Canale costituito da M2 (M1-M3-M4 per la struttura)
- Sito di legame Ach → tasca idrofilia; zona importante tra aa 180 e 200 → Cys192 e Cys193; legami accessori con Tyr e Trp su altre subunità
- Un unico gene codifica per le 2 subunità  $\alpha$  anche se le 2 subunità hanno una diversa capacità di binding
- Ach si lega a un sito (-) e (+), li avvicina → slittamento tra subunità → apertura canale
- Apertura del canale → depolarizzazione della membrana
- R per Ach non ha elevata capacità di selezione tra diverse specie ioniche con ugual carica.

#### CANALE IONICO:

- Definito in seguito ad uso di Non Competitive Blockers (NCB)
- Legandosi ad un sito diverso blocco effetto Ach in maniera non competitiva

- Riduco durata apertura e/o aumento desensibilizzazione
- Regolazione allosterica → nel canale: 1 molecola (HIGH AFFINITY); nel bilayer: 10-30 molecole (LOW AFFINITY)
- Cloropromazina → NCB, lega alla Ser di 4 subunità poste su M2 (formano le pareti canale)
- Attivazione continua del canale → DESENSITIZZAZIONE (proprietà intrinseca solo per canale nicotinic)

Il R esiste in diversi stadi conformazionali → RESTING (riposo); ACTIVE (attivo); DESENSITIZZATO (inattivo, desensitizzato)

- ANTAGONISTI COMPETITIVI → favoriscono la forma Restino
- AGONISTI → favoriscono la forma Active e a lungo andare → Desensitizzato
- MUTAZIONE dell'anello M2 in Leu → il R non si desensibilizza

PKA → fosforila subunità  $\delta$  ed  $\epsilon$  → aumenta apertura spontanea di R

PKC → fosforila  $\alpha_1$  e  $\delta$  → aumenta velocità con cui R si desensibilizza

TK → fosforila  $\beta_1$  e  $\delta$  → kinasi attivate da 2° messaggeri prodotti da altri R

I RECETTORI dell'ACH sono:

- nicotinici (ionotropi) → neuronali
- muscarinici (metabotropi)
- 10 geni: 8 subunità  $\alpha$  e 3 subunità  $\beta$
- M2 delimita il canale
- Subunità analoghe a AchR muscolare
- Processi apprendimento, memoria, Alzheimer

MIASTENIA GRAVE:

- debolezza muscolare
- affaticamento
- scarsa resistenza
- ptosi palpebrale
- associata a timoma
- diminuzione recettori nicotinici postsinaptici a causa di Ab specifici
- TERAPIA → anticolinesterasici, farmaci immunosoppressori, timectomia

GABA:

- neurotrasmettitore inibitorio
- decarbossilazione acido glutammico → **glutammato decarbossilasi (GAD)**
- GABA-T → enzima che degrada il GABA

EPILESSIA causa una diminuzione del tono inibitorio

- *valproato di Na<sup>+</sup>*: stimola GAD e inibisce GABA-T → non interviene sul R e quindi aumenta GABA
- *acido nipecotico*: blocca uptake neuronale di GABA → non interviene sul R e quindi aumenta GABA

NEUROTRASMETTITORE:

- aumenta la concentrazione di GABA e GAD nei sinaptosomi (artefatti)
- liberazione spontanea ed evocata da stimolazione
- R per GABA
- Sistema di ricaptazione
- Nel SNC e midollo spinale

3 tipi di R:

- 1) GABA<sub>A</sub>: R canale del Cloro, nella corteccia, talamo, cervelletto, midollo spinale, rene, pancreas; sito di binding per BZ (benzodiazepine) e F convulsivanti

- 2) GABA<sub>B</sub>: associati al K<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup>; non legano BZ ma *baclofen*; nel SNC, presinaptici (inibiscono canali VOCC e rilasciano neurotrasmettitori) e postsinaptici (canale K<sup>+</sup> → iperpolarizzazione)
- 3) GABA<sub>C</sub>: associati a canali per il Cl<sup>-</sup>; nella retina; insensibili alla bicucullina e baclofen

#### GABA<sub>B</sub>:

- SNC
- Periferia: gangli, utero, cellule muscolari lisce, fegato
- A livello presinaptico → liberazione neurotrasmettitore
- Metabotropi accoppiati a A-proteine
- Modulano riduzione Adenilato Ciclasi → diminuzione fosforilazione canali Ca<sup>+2</sup> → riduzione influsso di Ca<sup>+2</sup> → riduzione release di neurotrasmettitori
- Accoppiati a PLC e/o canali
- GABA<sub>B1</sub> → SNC
- GABA<sub>B2</sub> → periferia
- ANTAGONISTI: bloccano R GABA<sub>B</sub>; per ripristinare la memoria; *faclofen*
- AGONISTI: nelle sindromi depressive

#### GABA<sub>C</sub>:

- retina
- canale del Cl<sup>-</sup>
- R- IONOTROPO insensibile ad antagonisti come *bicucullina* e BZ
- Subunità ρ<sub>1</sub> ρ<sub>2</sub> → OMOOLIGOMERI
- Non desensitizzano
- Da questi può essersi evoluto il GABA<sub>A</sub>
- Controllo inibitorio delle risposte indotte dalla luce

#### GABA<sub>A</sub>:

- pre e post sinaptico
- accoppiati al canale del Cl<sup>-</sup>
- R per neurotrasmettitori INIBITORI nel cervello
- pentomero
- Il GABA si lega d un sito di legame primario → ingresso Cl<sup>-</sup> nelle cellule nervose che si iperpolarizzano e quindi non possono raggiungere il potenziale d'azione

#### SITO DI LEGAME (principalmente su β)

- per GABA
- F GABA-mimetici (*muscimolo*)
- F GABA-antagonisti (*bicucullina*)

#### SITO DI LEGAME (α,β,γ, effetti opposti alle BZ che causano ansia e convulsioni):

- per BZ
- F BZ-mimetici (*β-carboline*)

#### SITO DI LEGAME (all'interno del canale BT, etanolo, anestetici generali, steroidi):

- per *barbiturici* (BT)
- F BT-antagonisti (*picrotossina*)
- Per organofosfati

#### BENZODIAZEPINE:

- ansiolitici, ipnotici, anticonvulsivanti, effetto miorilasciante e se si aumenta la dose → atassia
- si legano alla subunità α e sono modulatori positivi del GABA
- facilitano trasmissione GABAergica
- range terapeutico alto
- la subunità γ → capacità alle BZ di modificare allostericamente la conformazione β dove si trova il GABA BINDING SITE → aumenta flusso di Cl<sup>-</sup> → iperpolarizzazione

- sinergismo farmacologico
- aumentano la frequenza di apertura del canale
- sito di legame BZ-1 → high affinity, nel cervelletto,
- sito di legame BZ-2 → low affinity, ippocampo, corteccia, midollo spinale
- sito di legame BZ-3 → low affinity, cervelletto
- $\beta$ -carboline → ansiogeno

#### LIGANDI ENDOGENI per sito BZ:

- modulatori allosterici
- GABA modulino
- DIF (*diazepam inhibitory factor*)
- *B-carboline*
- DBI (*Diazepam binding inhibitor*)
- ODN (*octadecaneropeptidi*) si frammentano in DBI e hanno attività ansiogena

#### AGONISTI:

- BZ (*nitrozapam, triazolam*)
- Imidazopiridine (*zolpidem*)
- Derivati  $\beta$ -carboline (*aberconil*)
- Effetti ansiolitico, ipnotico, anticonvulsivante
- Potenziano la trasmissione GABAergica

#### AGONISTI PARZIALI:

- *imidozenil*
- *bretozenil*
- efficacia inferiore a BZ ma buona attività ansiolitica e anticonvulsivante
- meno effetti collaterali
- ripristino normale funzione GABAergica

#### ANTAGONISTI:

- *flumazenil*
- spiazzano le BZ
- tolleranza e dipendenze dalle BZ

#### AGONISTI INVERSI:

- $\beta$ -carboline
- proprietà opposte a BZ
- modula in senso negativo l'attività del R per il GABA riducendo la sensibilità al GABA

#### TOLLERANZA alle BZ:

- molecole con elevata affinità
- buona attività ma breve durata d'azione
- alterazioni mRNA → modifica subunità → insensibilità ai F

#### BARBITURICI:

- potenziano azione GABA legandosi nel lume del R
- aumentano tempo di apertura del canale
- attivano flusso  $Cl^-$  indipendente da GABA
- depressione dose-dipendente generalizzata → coma → morte
- basso indice terapeutico

PICROTOSSINA e TBPS Binding Site → all'interno del canale e riducono entrata del  $Cl^-$  per ingombro sterico

NEUROSTEROIDI e GABA → steroidi: modulatori allosterici del  $GABA_A$

- aumentano attività agonisti
- aumentano attività BZ
- a dosi elevate attivano direttamente il R
- alcuni modulano negativamente la funzione del R del GABA

- sito in prossimità del canale
- incrementano la durata media di apertura del canale e aumentano la frequenza di apertura (BZ)
- vengono prodotti anche nel SNC e partecipa il recettore BZ-3 mitocondriale che trasforma colesterolo → progesterone
- modulatori positivi della trasmissione GABAergica, potenziano il flusso di Cl<sup>-</sup>
- a basse dosi hanno effetto simile a BZ e a dosi elevate simile a BT
- attività anestetica, anticonvulsivante
- manca antagonista selettivo

#### ANESTETICI GENERALI:

- potenziano trasmissione GABAergica
- aumentano ingresso di Cl<sup>-</sup>

#### ETANOLO:

- anestetico generale
- sinergia con BZ e BT
- importante Ser-Loop intracellulare → fosforilazione PKC → influisce l'alcool su tale sito

#### R per GLICINA:

- neurotrasmettore inibitorio
- nel midollo spinale e corteccia cerebrale
- IONOFORO del Cl<sup>-</sup>
- Proteina pentamerica (3α e 2β)
- Simile a AchR e GABA<sub>A</sub>
- Recettore canale
- AGONISTI → Gly, β-alanina
- ANTAGONISTI → *strychnina* (veleno)
- GlyR è tenuto in loco da **gefirina** legata a subunità β e collegata al citoscheletro
- GlyR nei neuroni → CLUSTERS, grazie alla gefirina, nella membrana postsinaptica

#### MODULAZIONE R:

- Zn<sup>+2</sup> a basse concentrazioni aumenta attività del GlyR, ad alte concentrazioni la inibisce
- Fosforilazione: PKA aumenta attività GlyR, PKC diminuisce attività GlyR
- Eventi multipli di fosforilazione regolano GlyR attraverso un CROSSTALK Cellular Mechanism

#### PATOLOGIE:

- sclerosi laterale
- Parkinson
- Perdita neuronale
- Sindrome spastica
- Mutazione puntiforme α<sub>1</sub> → iperreflessia umana e diminuisce affinità Gly

#### FARMACOLOGIA:

- AGONISTI → β-alanina e Serina
- ANTAGONISTI → Stricnina: eccitazione SNC e si lega con alta affinità
- BZ e BT → aumenta tono inibitorio a livello centrale

#### CANALI IONICI VOLT-DIPENDENTI

- pori macromolecolari che permettono flusso di IONI (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>) ed hanno effetti su potenziale di membrana
- componenti carichi che avvertono il campo elettrico
- chiusi normalmente ma con ddp (differenza di potenziale) → aperti

#### RIPOSO:

- filtro di selezione aperto

- cancello di in attivazione chiuso
- il canale risulta CHIUSO

#### APERTO:

- filtro di selezione aperto
- cancello di in attivazione aperto
- il tutto risulta APERTO

#### INATTIVAZIONE:

- filtro di selezione aperto
- cancello di in attivazione chiuso
- il tutto risulta INATTIVATO

#### CANALI VOLT-DIPENDENTI:

- macromolecole PM~200kDa
- filtro di selettività all'esterno
- poro acquoso
- cancello di in attivazione nel citoplasma
- sensori di voltaggio regolano il cancello
- proteine che ancorano in membrana il canale
- subunità principale  $\alpha$  (autonoma e con sensore) e diverse subunità accessorie
- N e C-ter intracitoplasmatici
- $\alpha$  ha 4 territori omologhi (transmembrana) che formano il canale e ogni territorio ha 6 segmenti transmembrana. Tra il 5 e 6 c'è una zona detta p o M5 che si immerge nella membrana senza attraversarla e forma l'imboccatura del poro

#### CANALE AL $\text{Na}^+$ :

- PM ~ 250kDa
- Struttura pseudotetrameric → 4 domini di cui ogni dominio con 6 tratti transmembrana (S1-S6)
- Segmento S4 → sensore di voltaggio con 8 cariche positive (Arg)
- S1-S2-S3 → alfa-eliche
- S5-S6 → idrofobici
- S4 → mantenimento in posizione del potenziale negativo della cellula e quando si ha depolarizzazione → slittamento verso l'esterno → piccole correnti e ruota a spirale di  $60^\circ$  → mutamento conformazionale → apertura
- Modulazione in senso positivo e negativo con cAMP, PKC, PKA, IP3,  $\text{Ca}^{+2}$
- Inattivazione: chiusura canale indipendente da ddp; il cancello è il segmento citoplasmatico tra dominio 3 e 4
- F modulano canale non l'apertura (ddp); anestetici locali, antiaritmici, anticonvulsivanti, tossine

#### TOSSINE INIBITORIE:

- tetrodotossina (pesce palla) → blocca tutti i canali  $\text{Na}^+$
- saxitossina (dinoflagellati) → blocca tutti i canali del  $\text{Na}^+$

#### FARMACI:

- *lidocaina*, *benzocaina* → bloccano apertura canale → blocco depolarizzazione → no-conduzione
- anestetici locali: molecole cariche entrano se il canale è attivato e si legano all'interno; le molecole non cariche attraversano il bilayer e raggiungono il sito d'azione dall'interno e si legano in prossimità del cancello M
- antiaritmici (*chinidina*) → bloccano canali  $\text{Na}^+$  cardiaci e agiscono su cellule depolarizzante (danneggiate) e non alterano le altre
- anticonvulsivanti (*carbamazepine*) → inibiscono canali  $\text{Na}^+$ -voltaggio dipendenti

- neuroprotettivi → per ischemia, ictus, blocco canali  $\text{Na}^+$  nelle prime fasi dell'ischemia (*flunarizina*), blocco overload di  $\text{Na}^+$  → risparmio ATP → mantengo gradiente ioni → diminuzione rigonfiamento cellulare.

#### OMEOSTASI $\text{Ca}^{+2}$ INTRACELLULARE:

Il Calcio influisce sul potenziale di membrana e in cellula è presente ad una concentrazione di  $10^{-7}$  M, mentre all'esterno è di circa  $10^{-3}$  M. Il Calcio all'interno della cellula è legato a molecole nel citosol o in organuli dove può essere legato o libero (quest'ultimo è quello funzionale).

#### MEMBRANA PLASMATICA → CANALI AL $\text{Ca}^{+2}$ :

##### VOCC:

- operati da voltaggio, apertura dovuta a ddp
- bersaglio di F Ca-antagonisti
- si trovano in neuroni, fibre muscolari scheletriche, cellule endocrine, gliali, fibre muscolari lisce, fibroblasti

##### ROCC:

- operati da Recettore, apertura attivata da agonista (gly, glu,  $\text{Ca}^{+2}$ , IP3)
- sottotipo R per gli aa eccitatori sensibile a NMDA e molto permeabile al  $\text{Ca}^{+2}$
- sottotipi R neuronali di AchR molto permeabili al  $\text{Ca}^{+2}$

##### SMOCC:

- operati da Secondo Messaggero
- dipende dai R accoppiati a G-proteine → fosfolipasi C → IP3
- rilascio di  $\text{Ca}^{+2}$  da organuli intracellulari sensibili a IP3
- si trovano in cellule nervose e neuroendocrine

##### SDCC:

- Store Dependent  $\text{Ca}^{+2}$  Channel
- Sensibili a messaggero retrogrado che si origina da depositi cellulari a rapido scambio che si svuotano
- Si trovano in quasi tutte le cellule

#### POMPE E TRASPORTATORI:

- estrusione  $\text{Ca}^{+2}$  attraverso membrana per mantenere giusta la concentrazione di  $\text{Ca}^{+2}$
- **POMPA al  $\text{Ca}^{+2}$** : si trova in membrana, consuma ATP, espelle 1 molecola di  $\text{Ca}^{+2}$  ed è modulata da **calmodulina** che lega 4  $\text{Ca}^{+2}$  che si legano al sito regolatorio della pompa e aumenta la  $V_{\text{max}}$
- Se l'aumento di  $\text{Ca}^{+2}$  è maggiore allora si attiva lo **SCAMBIATORE  $\text{Ca}^{+2}/\text{Na}^+$**  che è un antiporto, ha poca affinità ma alta capacità, espelle 1 molecola di  $\text{Ca}^{+2}$  e internalizza 3 molecole di  $\text{Na}^+$  (la carica in più serve a controbilanciare) e questo sistema dipende dal gradiente di  $\text{Na}^+$  generato dalla  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi
- F che bloccano la pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi sono i *glucosidi cardioattivi* che permettono accumulo di  $\text{Ca}^{+2}$  nel reticolo sarcoplasmatico e producono un effetto inotropo positivo.

#### ORGANULI INTRACELLULARI:

RETICOLO ENDOPLASMATICO → nel muscolo si specializza in sarcoplasmatico con proteine responsabili di accumulo, deposito, liberazione di  $\text{Ca}^{+2}$ .

##### POMPA al $\text{Ca}^{+2}$ :

- ATPasi
- SERCA (Sarcoplasmic Reticulum Endoplasmic  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPasi)
- 2 ioni  $\text{Ca}^{+2}$  / 1 ATP
- Non regolata da calmodulina

##### PROTEINE LUMINALI LEGANTI $\text{Ca}^{+2}$ :



- famiglia delle **calsequestrine** espresse dalle fibre muscolari
- legano grosse quantità di  $\text{Ca}^{+2}$
- bassa affinità per consentire il rilascio

#### CANALI IONICI:

- comunicazione tra il lume dell'organulo e il citosol
- sensibili a *rianodina* (tipo 1 a livello muscolare; tipo 2 a livello cardiaco e SNC; tipo 3 in vari tessuti). La *rianodina* denominata CIRC ( $\text{Ca}^{+2}$  Induced  $\text{Ca}^{+2}$  Release), cADP-ribosio agisce come secondo messaggero; la caffeina attiva il canale e la *rianodina* impedisce la chiusura
- sensibili a IP3
- IP3 è attivatore
- ATP e  $\text{Ca}^{+2}$  sono modulatori allosterici

Il **nucleo** segue la  $[\text{Ca}^{+2}]$  del citoplasma

L'**apparato di Golgi** → secerne vescicole con grandi quantità di  $\text{Ca}^{+2}$

#### MITOCONDRI:

- ddp di circa -200mV a cavallo della membrana interna e il ddp è la forza di trazione per i trasporti
- se la concentrazione di  $\text{Ca}^{+2}$  aumenta, il gradiente può dissiparsi → precipitano come fosfati di  $\text{Ca}^{+2}$

#### Organuli:

- la concentrazione di  $\text{Ca}^{+2}$  varia a seconda delle funzioni (proteine, attivatore enzimi, trascrizione eduplicazione DNA, espressione di geni, attiva enzimi limitanti Krebs nei mitocondri)
- calciosomi

#### CITOSOL:

Meccanismi di regolazione positiva → influsso dall'esterno e rilascio da depositi cellulari

Meccanismi di regolazione negativa → estrusione dalla cellula e accumulo in organuli

**STIMOLO:** *l'agonista si attacca al R accoppiato a PLC → IP3 e contemporaneamente entra  $\text{Ca}^{+2}$  da SMOCC → IP3 induce rilascio  $\text{Ca}^{+2}$  dai depositi dotati di R specifici →  $[\text{Ca}^{+2}]$  decade per l'azione di rimozione delle SERCA e pompe/trasportatori della membrana ma è ancora elevata a causa di SMOCC e SDCC attivati da un segnale (CIF – anionico) generato da depositi svuotati. Grazie alla SERCA → ricarica dei depositi.*

#### PROTEINE LEGANTI $\text{Ca}^{+2}$ :

- proprietà tampone del citosol
- motivo strutturale comune: EF-HAND → lega il  $\text{Ca}^{+2}$  in modo selettivo e ad alta affinità
- *calmodulina* → subunità regolativa  $\text{Ca}^{+2}$ -dipendente di alcuni enzimi
- *troponina* (contrazione muscolare); *calpaina* (proteasi intracellulare attivata da  $\text{Ca}^{+2}$ )
- **annessine:** famiglia che lega  $\text{Ca}^{+2}$  insieme a fosfolipidi (fosfatidilserina)

Data la lentezza di diffusione del  $\text{Ca}^{+2}$  nel citosol, gli ioni possono saturare rapidamente il potere  $\text{Ca}^{+2}$  tampone di quella piccola zona di citosol circostante il canale formando *microterritori* con alta  $[\text{Ca}^{+2}]$ . Sono zone strategiche come le zone attive della membrana presinaptica dove avviene la fusione (esocitosi  $\text{Ca}^{+2}$  dipendente) delle vescicole. Inoltre a causa di questa lentezza di diffusione nel citosol ci sono **organuli a rapido scambio di  $\text{Ca}^{+2}$**  e la loro attivazione da parte di IP3 è sincrona.

#### PATOLOGIE LEGATE AL $\text{Ca}^{+2}$ CELLULARE:

- mitocondri, citoscheletro, membrane
- eccitotossicità nei neuroni
- morte cellulare → attivazione enzimi litici  $\text{Ca}^{+2}$ -dipendenti

## FARMACOLOGIA:

### Ca<sup>+2</sup>-ANTAGONISTI:

- si oppongono all'apertura del canale
- effetto sinergico tra loro
- antiipertensivi, antiaritmici, antianginosi → canali L
- *diidroperidine* agiscono a livello vascolare selettive per le coronarie
- *fenilalchilamine (verapamil)* agiscono a livello cardiaco e bloccano VOCC
- *benzotiazepine*
- questi F hanno interazione allosterica
- *BAYK8466* → aperiente canale Ca<sup>+2</sup>

### AZIONE VASCOLARE:

- aumento Calcio intracellulare → Ca<sup>+2</sup>-calmodulina → attivazione miosina → interazione con actina → contrazione
- Ca<sup>+2</sup>-antagonisti inibiscono entrata di Ca<sup>+2</sup> → vasodilatazione arteriosa (non venosa), antiipertensivi, vasodilatanti, antianginosi

### AZIONE CARDIACA:

- aumento Calcio intracellulare → Ca<sup>+2</sup>-troponina → interazione actina-miosina → contrazione
- Ca<sup>+2</sup>-antagonisti hanno effetto isotropo negativo → blocco canali VOCC a livello del nodo del seno, nodo atrio-ventricolare delle fibre di conduzione, rallentato ritmo pace-maker del nodo del seno, antiaritmici

### EFFETTI COLLATERALI:

- associati a vasodilatazione periferica
- *diidroperidine*: ipotensione, cefalea, nausea, edemi periferici o polmonari
- effetto negativo sistema endocrino
- nuovo utilizzo Ca<sup>+2</sup>-antagonisti nelle cefalee e vasospasmo

### TOSSINE:

- *Cu-conotossina*: veleno di alcune lumache di mare, attivo sui canali N
- *Cu-agatossina*: veleno di alcuni ragni attivo sui canali P

### CANALI T → responsabili eccitabilità (contrazione, secrezione ormoni e neurotrasmettitori)

- BASSA SOGLIA: aprono in risposta a piccole depolarizzazioni, si inattivano velocemente, controllano eccitabilità cellulare e attività ritmica di cellule muscolari e neuronali
- ALTA SOGLIA: aprono con grosse depolarizzazioni, si inattivano lentamente, responsabili dell'aumento della concentrazione di Ca<sup>+2</sup> necessario perché agisca da secondo messaggero

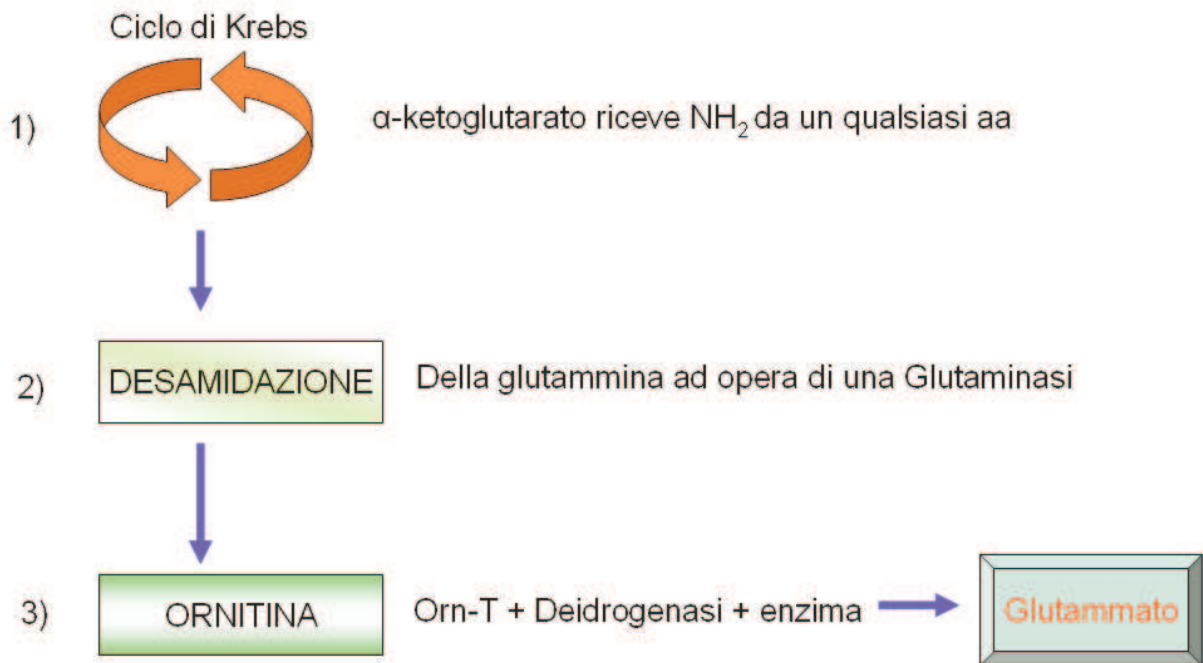
### VOCC:

- T (transiente)
- L
- N (neuronale)
- P (Purkinje)

## RECETTORI PER AA ECCITATORI:

### Glutammato:

- neurotrasmettitore coinvolto in apprendimento, memoria, controllo sensoriale e in patologie come le convulsioni, invecchiamento, degenerazione neuronale
- aa più abbondante del SNC e siccome la BEE è impermeabile al Glu, allora deve essere sintetizzato in loco



- si trovano nel cervello, cellule gliali e neuronali, ippocampo, corteccia, cervelletto, striato, talamo e soprattutto telencefalo
- il Glu è liberato in maniera  $\text{Ca}^{+2}$  dipendente da terminali neuronali in seguito a depolarizzazione
- 5 cDNA che codificano per proteine trasportatrici del Glu e differiscono tra loro per la distribuzione tissutale e affinità per il Glu

#### RECETTORI:

IONOTROPI: complessi polimerici da 4-5 subunità ciascuno  $\rightarrow$  **canale ionico transmembrana**

##### 1) AMPA:

- R per l'acido  $\alpha$ -amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazol-propionico
- Costituito dalle subunità  $\rightarrow$  GluRA, GluRB, GluRC, GluRD
- Cinetiche di attivazione e desensitizzazione rapide
- Permeabili a  $\text{Na}^+$  e poco al  $\text{Ca}^{+2}$  (permeabili al  $\text{Ca}^{+2}$  se manca GluRB)
- Si trovano in membrana postsinaptica e sono responsabili della risposta eccitatoria (depolarizzazione)
- *Kainato*  $\rightarrow$  interagisce con questi R  $\rightarrow$  alterazioni omeostatiche e depolarizzazioni lunghe
- Q/R dell'M2  $\rightarrow$  R: impermeabile a ioni  $\text{Ca}^{+2}$
- Il gene che codifica per GluRB contiene il codone per Q nel sito Q/R ma l'mRNA codifica per R  $\rightarrow$  EDITING dell'mRNA
- *Flip*: proteina sempre espressa in neuroni  $\rightarrow$  inattivazione lenta
- *Flop*: proteina espressa tardivamente e insieme a Flip  $\rightarrow$  inattivazione veloce

##### 2) KAINATO:

- R per il kainato

- Costituito dalle subunità → GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2
- Permeabile a  $\text{Na}^+$  e /o  $\text{K}^+$
- GluR5 e GluR6 → Q/R sia Q che R e GluR6 → 2 editing in M1 → 8 mRNA
- Si trova nei neuroni pre e postsinaptici

### 3) NMDA:

- R per N-metyl-D-Aspartato
- Costituito dalle subunità → NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D
- Cinetiche lente, può essere bloccato dall'interno con F ma diffondono poco nel SNC
- Permeabile a ioni solo con depolarizzazione (blocco da  $\text{Mg}^{+2}$ )
- Richiede 2 neurotrasmettitori: Glu e Gly (cotrasmettitore) per essere attivato
- Permeabile al  $\text{Ca}^{+2}$
- NR1 → diverse forme di splicing → diverse proprietà
- NR2 → diverse forme → diverse caratteristiche elettrofisiologiche
- Q/R → N (Asparagina) del M2 → alta permeabilità al  $\text{Ca}^{+2}$  e blocco  $\text{Mg}^{+2}$
- Si trova nelle membrane postsinaptiche
- Agonisti o antagonisti del sito della Gly favoriscono o meno attività NMDA → anticonvulsivante

## CARATTERISTICHE MOLECOLARI RECETTORIALI:

### R METABOTROPI:

- mGluR
- porzione X (partecipa alla regione per riconoscere Glu) analoga a LIVBP (Lue/Ile/Val-binding-protein) e presente anche in iGluR
- porzione S1 ricca di Cys che precede la prima  $\alpha$ -elica
- M1-M7 → 7 territori transmembrana
- C-ter intracellulare

### R IONOTROPI:

- iGluR
- Porzione X
- S1 e S2 analoghi a proteine batteriche periplasmatiche QBP (Glutamine Binding Protein)
- LAOBP e PhosBP → sito di legame per Glu
- S1 e S2 → analogie anche con KBP (Kainato Binding Protein)
- M1-M4 → 4 regioni transmembrana, M2 → sito Q/R per selezionare ioni e ricorda il tratto P degli altri recettori canale

### FARMACOLOGIA dei mGluR:

- neuroprotezione
- controllo movimento
- attacchi epilettici
- modulazione iGluR
- bersaglio per regolare tono eccitatorio

R-NMDA → sbloccato da  $\text{Mg}^{+2}$  per funzionare

R-AMPA e KAINICO → inducono depolarizzazione necessaria a R-NMDA

Ogni R → fenomeni di plasticità neuronale

### METABOTROPI:

- si trovano in neuroni e glia
- processi sinaptici lenti
- azione mediata da G-proteine
- agonista selettivo → ACPD
- 7 domini M e grosso N-terminale
- M3 e M4 → sequenze per attivare le G-proteine
- C-terminale → sequenze per fosforilazione

- Memoria e apprendimento
- Processi anche ionotropi

3 CLASSI:

1°→mGluR1 e mGluR5→aumentano PLC

2°→mGluR2 e mGluR3→diminuiscono AC

3°→mGluR4 e mGluR6/7/8→diminuiscono AC

PATOLOGIE:

- AIDS: una proteina del virus attiva NMDA-R
- Epilessia: aumenta sensibilità al Glu e aumenta numero di R
- Schizofrenia: toglie tono eccitatorio
- ICTUS: eccesso di Glu→chiusura vaso sanguigno.. Senza ossigeno e glucosio→no irrorazione dei neuroni. Secrezione di Glu→NMDA-R→passaggio di Na<sup>+</sup> e Ca<sup>+2</sup> e richiamo di acqua in cellula. Inversione scambiatore Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup>→accumulo di Ca<sup>+2</sup> in cellula. Degradazione fosfolipidi, per ossidazione→espansione fenomeno ischemico. Morte neuronale.

INTERVENTI:

- ridurre liberazione Glu con fattori che stimolano R per Adenosina
- inibizione sintesi neurotrasmettitore
- diminuzione temperatura cerebrale
- somministrazione antagonisti di Glu
- antagonisti Ca<sup>+2</sup>VOCC (*diidroperidine*, ma attivi solo su L)
- inibire PKC

Gli AGONISTI dei R per gli aa eccitatori vengono assunti con la dieta e possono causare Sclerosi Laterale Amiotrofica.

PLASTICITA' NEURONALE:

Capacità di modificare il SNC nel corso della vita con le esperienze, l'apprendimento e la memoria.

APPRENDIMENTO→processo attraverso il quale si acquisiscono nuove conoscenze

MEMORIA→l'apprendimento diventa memoria; nell'ippocampo e strutture libiche; acquisizione stabile e consolidata a breve termine (procedurale) o a lungo termine (associativa)

PLASTICITA'→i neuroni possono accrescersi o ridursi→modificazione afferente-efferenze in funzione di stimoli locali. Coinvolge le SINAPSI.

1949 – Hebb→la sinapsi è sede critica della modificazione (somatica) plastica e la memoria è la variazione persistente nel rapporto fra neuroni (struttura e biochimica).

1976 – Kandel:

- studia Aplasia (lumaca di mare)→riflesso monosinaptico
- abitudine, sensibilizzazione, condizionamento
- getto d'acqua sul sifone della lumaca→contrazione branchia
- il getto arriva sui meccanocettori presenti sul sifone→neuroni sensoriali→sinapsi con motoneuroni→contrazione
- ABITUDINE: più volte l'esperimento a intervalli di tempo regolari→prima risposta forte→memoria→successive più deboli
- SENSIBILIZZAZIONE: prima del getto d'acqua si esegue uno shock elettrico sulla coda→risposta abnorme allo stimolo
- CONDIZIONAMENTO: prima del getto d'acqua applico un altro stimolo (luce)→apprende che precede il getto→contrae la branchia prima del getto
- Memoria a breve termine→meccanismi di ripetizione→memoria duratura

- Quando il potenziamento sinaptico ha durata lunga → long term potentiation (LTP) → aumento di trasmissione sinaptica a livello delle regioni dell'ippocampo
- Se dopo uno stimolo ad alta frequenza ne do uno a bassa frequenza → risposta aumentata → memoria
- Se alla stimolazione c'è la presenza di un antagonista del recettore NMDA (plasticità e memoria) → no LTP (ipotesi: LTP → liberato Glu)
- LTP mantenuta nel tempo grazie a messaggeri retrogradi: N=O

N=O:

- nitrossido (gas)
- prodotto dal neurone ad opera di NO-sintasi
- il  $Ca^{+2}$  stimola NO-sintasi nel neurone post sinaptico → aumento N=O
- diffonde nel bilayer → sostiene release di Glu
- inibitori della NO-sintasi → blocco mantenimento LTP

Altri candidati nell'LTP sono il C=O, PAF (metabolismo della lipoossigenasi), AA (Acido Arachidonico e suoi metaboliti)

LTP → necessita di sintesi proteica

FARMACI che stimolano i processi cognitivi → *caffeine, naloxone, amfetamina, colinomimetici, NOotropi*. Quelli che deprimono la memoria sono → *BT, BZ, litio, antidepressivi, alcool*.

#### RECETTORI ACCOPPIATI A G-PROTEINE:

- scoperte nel 1994
- sistema trasduzionale
- ruolo in crescita cellulare
- percezione visiva e olfattoria
- ampia famiglia, attività GTPasica, più subunità ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )
- legame col ligando → modifica il terzo loop della M7 → proteina G
- breve attività costitutiva indipendente dal ligando
- mutazioni sul terzo loop → R costitutivamente attivato
- R è promotore della transizione forma attiva – forma passiva delle proteine G

$\alpha$ :

- legame GTP
- attività GTPasica
- legame per tossine (pertosse, colera)
- $\alpha_s$  → stimolazione dell'AC (Adenilato Ciclasi)
- $\alpha_i$  → inibitore: stimola canali  $K^+$
- $\alpha_o$  → "other", stimola PLC, inibisce canali  $Ca^{+2}$
- $\alpha_q$  → stimola PLC $\beta$

$\beta\gamma$  può regolare altri fattori:

- no-ligando →  $\alpha$  lega GDP → affine a  $\beta\gamma$  → ( $\alpha\beta\gamma$ )
- ormone si lega al R → interazione R- $\alpha\beta\gamma$  → GDP → GTP nella subunità  $\alpha$
- GTP → modifica  $\alpha$  →  $\alpha + \beta\gamma$  che si dissociano da R
- $\alpha$ -GTP → interazione con effettore stimolando o inibendo l'attività → secondo messaggero
- GTPasica → idrolisi del GTP → GDP → termina modulazione effettore
- $\alpha_{GDP}$  si riassocia:  $\alpha\beta\gamma$
- $\alpha\beta\gamma$ -GDP → nuova attivazione
- ACCENSIONE SEGNALE: recettore
- SPEGNIMENTO SEGNALE: attività GTPasica

#### TOSSINA PERTOSSE:

- substrato: residuo di Cys su  $\alpha_i/\alpha_o$
- ADP-ribosilazione → inibisce attivazione delle 4 proteine ( $\alpha$  è legata sempre a GDP)

- Tutti i processi di traduzione sono bloccati
- Turnover di 20 giorni

#### TOSSINA COLERA:

- ADP-ribosilazione solo quando  $\alpha$  è legata a GTP
- Proteina sempre attiva
- Aumenta cAMP (secondo messaggero)
- Perdita di acqua, diarrea

#### REGOLAZIONE G-PROTEINE:

- down-regulation delle G-proteine se R è stimolato a lungo
- regolazione espressione genica
- ridotta stabilità mRNA-G-protein

#### MODIFICHE LIPIDICHE:

- G-protein  $\rightarrow$  modifiche post-trasduzionali
- Aggiunta lipidi su  $\alpha$  e  $\gamma$  per il corretto funzionamento
- PALMITOLAZIONE: sulle  $\alpha$  per associarsi in membrana e con effettore
- MIRISTILAZIONE: residuo di Gly su  $\alpha$  per interazione di  $\alpha$  con  $\beta\gamma$

#### PATOLOGIE:

- difetto genetico sintesi  $\alpha_s \rightarrow$  no normale risposta cellulare (pseudoparatiroidismo)
- mutazioni residui  $\alpha_s \rightarrow$  inibizione attività GTPasica (adenomi ipofisari, tumori tiroidei)

#### INTERAZIONI CON R:

- G-proteine  $\rightarrow$  attivate da un R
- Un R stimola più G-proteine diverse
- F mirano sul R ma non so le  $\beta$ -proteine che stanno sotto
- ANALOGHI del GTP  $\rightarrow$  alcune tossine naturali (*mastoparan* delle vespe)  $\rightarrow$  attivatori di G-proteine. *Suramin*  $\rightarrow$  release delle G-proteine  $\rightarrow$  GDP non è sostituito da GTP. Gli analoghi del GTP non sono selettivi.

#### RECETTORI PER FATTORI DI CRESCITA:

- R ad attività TK (Tirosin Kinasica)
- Dominio extracellulare: sito legame alta affinità (~100 aa e Cys), specifico
- Dominio transmembrana: residui idrofobici
- Dominio iuxtamembrana: citosol (~ 50 aa), funzioni regolatorie
- Dominio catalitico: attività kinasica (~ 250 aa)
- Dominio C-terminale: lega i trasduttori (~ 250 aa)
- A riposo  $\rightarrow$  monomeri
- Ligando + R  $\rightarrow$  DIMERIZZAZIONE  $\rightarrow$  attività autocatalitica  $\rightarrow$  TRANSFOSFORILAZIONE in Tyr

#### FATTORI DI CRESCITA:

- controllano ingresso e progressione del ciclo cellulare
- EGF (fibroblasti e glia)
- HGF (epatociti, endoteli)
- NGF (neuroni)
- Fattori di competenza: reclutano cellule quiescenti nel ciclo cellulare. Coinvolti in patogenesi e neoplasie e disturbi metabolici. Sono i prodotti dei PROTONCOGENI  $\rightarrow$  se mutati: ONCOGENI.
- Fattori di progressione: transizione G1  $\rightarrow$  S

#### PATOLOGIE:

- numero eccessivo di R  $\rightarrow$  aumentano le interazioni  $\rightarrow$  attivazione costitutiva  $\rightarrow$  CARCINOMI
- attivazione costitutiva anche con modificazione dominio extracellulare

#### DEATTIVAZIONE DEL R:

- il R è deattivato dalla sua stessa attività  $\rightarrow$  attivano kinasi che fosforilano R  $\rightarrow$  inattivazione

- rottura legame col fattore di crescita → R monomero

#### CONTROLLO FARMACOLOGICO:

- inibitori interazione ligando-R → Ab monoclonali contro epitomi extracellulari di R; *suramina* (antimalarico)
- inibitori attività catalitica TK → *quercetina*, *genisteina*: a largo spettro → tossici. *Erbimicina* agisce in modo specifico. *Tirfostine* interferisce col sito catalitico.

TUMORI SOLIDI e LEUCEMIE → associati a iperattivazione di RAS. Bersaglio terapeutico è la farnesilazione di RAS (RAS inserito in membrana). Inibitori Farnesil-transferasi.

#### RECETTORI INTRACELLULARI:

- R per ormoni steroidei
- R ormone tiroideo, acido retinico
- Alterano funzione cellulare → regolano espressione genica → corredo proteico
- **R-NUCLEARI**: estrogeni, progesterone, ormoni tiroidei, vitamina D, A
- **R-CITOPLASMATICI**: glucocorticoidi, mineralcorticoidi, androgeni
- R INATTIVI → R (300 kDa) + HSP (Heat Shock Protein) ed in seguito a interazione con ligando → dissociazione HSP e dimerizzazione del R che interagisce con HRE (Hormone Responsive Element)
- Superfamiglia con ugual organizzazione strutturale: 1) N-ter poco omologa; 2) parte centrale presenta sito di legame DNA e alta omologia; 3) C-ter sito di legame dell'ormone
- Unica catena polipeptidica

#### DNA-BINDING-SITE:

- DBS ~ 70 aa che facilitano interazione con DNA
- Cys (-) → struttura a dito con legami di coordinazione con lo Zinco (Zn-finger, selettivo per l'attacco al DNA)
- La parte vicino all'N-ter → specificità interazione HRE

#### LIGAND-BINDING-SITE:

- C-ter, LBS
- Aa idrofobici che formano una tasca

#### HSP-BINDING-SITE:

- porzione centrale e C-ter
- legami deboli interproteici
- HSP → ingombro sterico

#### SITI DI DIMERIZZAZIONE:

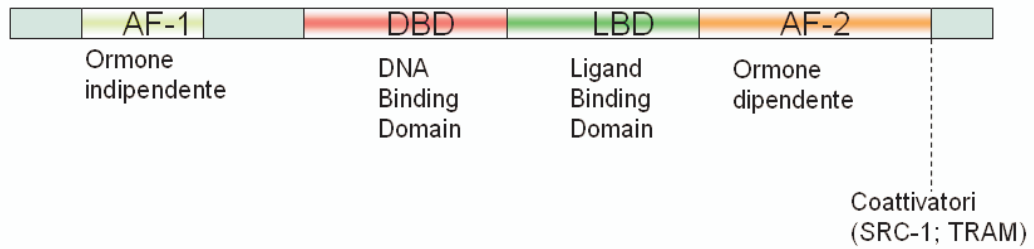
- necessaria la dimerizzazione per legame DNA con alta affinità
- regioni all'interno DBS e LBS

#### NH<sub>2</sub>-TER:

- meno conservato
- specificità d'azione
- attivazione della trascrizione
- assicura interazione con fattori diversi dell'apparato trascrizionale

#### GENE:





#### ATTIVAZIONE:

- R ha 3 valenze: lega ormone; lega HSP; lega specifiche sequenze di DNA
- Quando arriva l'ormone la proteina cambia conformazione → più lineare → esposti siti per interazione col DNA
- R dimerizza con altro R → nucleo → interazione col DNA

Attivazione anche senza ligando:

- R di membrana attivati
- R attivano PK
- PK fosforica R e HSP si allontanano
- R dimerizza → nucleo

#### HRE:

- Hormone Responsive Element
- Sequenze palindromiche
- Differiscono per numero di nucleotidi nell'asse di simmetria
- I R modulano la trascrizione di geni bersaglio diversi pur agendo su RE di sequenze molto simili
- Specificità d'azione → interazione con altri fattori di trascrizione

I R attivati interagiscono coi componenti del complesso d'insieme della trascrizione potenziando o rallentando l'efficienza e velocità di inizio.

#### INTERAZIONE:

- diretta
- adattatore: cofattore addizionale → coattivatori (SRC-1; TRAM)

Siccome questi R hanno elevata omologia strutturale tra loro, la specificità d'azione è data da:

- tropismo differenziale → assenza di un R in un determinato tessuto
- metabolismo tessuto specifico dei diversi ormoni → l'attività metabolica regola la concentrazione in modi diversi in tessuti diversi
- interazione preferenziale → con altre proteine che regolano trascrizione e che possono essere tessuto specifiche
- mutazioni del DNA → inaccessibile il gene

#### MODULAZIONE FARMACOLOGICA:

- 1) modificare segnale agendo sulla sintesi e/o secrezione di un ormone
- 2) modificare la sensibilità del tessuto modulando la sintesi del R
- 3) modificare la funzionalità del R con:
  - AGONISTI: sopprimere carenze vitaminiche
  - ANTAGONISTI: non attivano trascrizione e vanno su siti diversi del ligando
  - ANTAGONISTI TIPO 1 → non lega DNA perché è alterata la capacità di dimerizzare
  - ANTAGONISTI DI TIPO 2 → lega DNA ma non regola la trascrizione

#### R per ESTROGENI:

- agonista → *1,7-β-estradiolo*
- antagonista → *tamossifene* (nel tumore al seno)

R per ANDROGENI:

- agonista → *testosterone*
- antagonista → *ciproterone acetato*

R per CORTICOSTEROIDI:

- agonista → *aldosterone, cortisolo, cortisone* (leucemia, diuretico, anafilattico)
- antagonista → *spironolattone*

RECETTORI ORFANI:

- proteine citoplasmatiche
- simili a R intracellulari (superfamiglia)
- non si conosce ancora il LIGANDO.