

# ***Farmacologia cellulare e molecolare***

***PR***

## **III PARTE**

# **AMMINOACIDI COME NEUROTRASMETTORI**

# INIBITORI

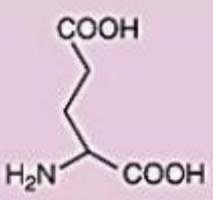
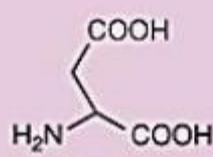
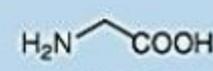
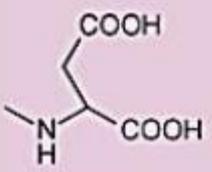
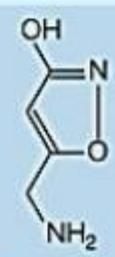
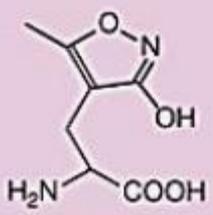
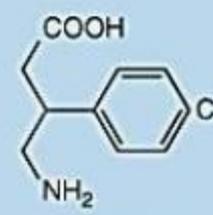
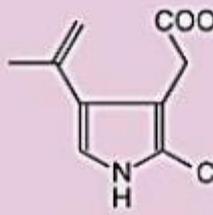
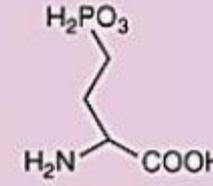
# ECCITATORI

1- Acido Gamma ammino  
butirrico (GABA)

3- Glutammato

2- Glicina

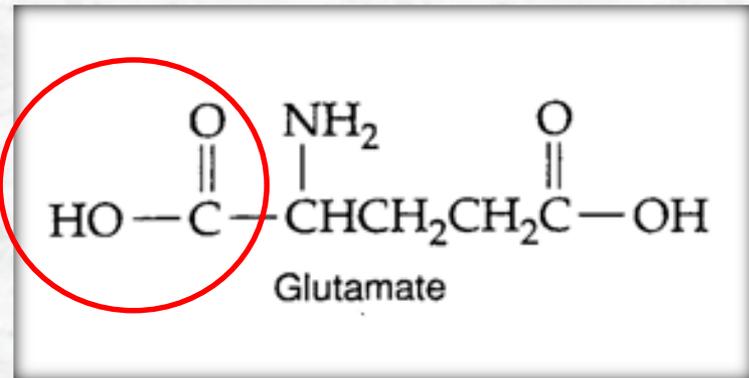
4- Aspartato

	EXCITATORY	INHIBITORY
TRANSMITTERS	 Glutamate	 GABA
	 Aspartate	 Glycine
SYNTHETIC ANALOGUES	 NMDA	 Muscimol
	 AMPA	 Baclofen
	 Kainate	
	 AP-4	

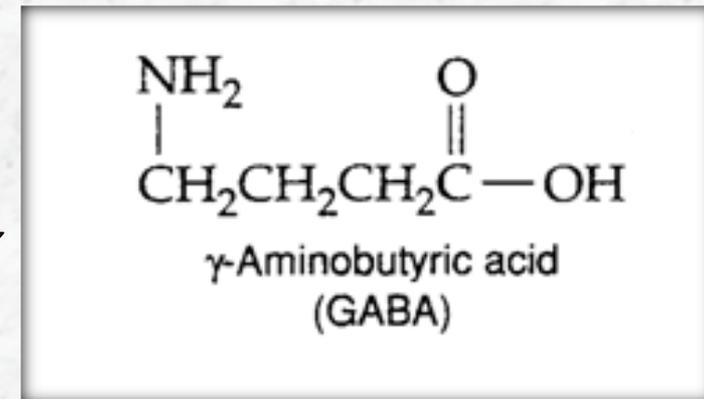
# **SISTEMA GABAERGICO**

# 1- Acido $\gamma$ - amminobutirrico (GABA)

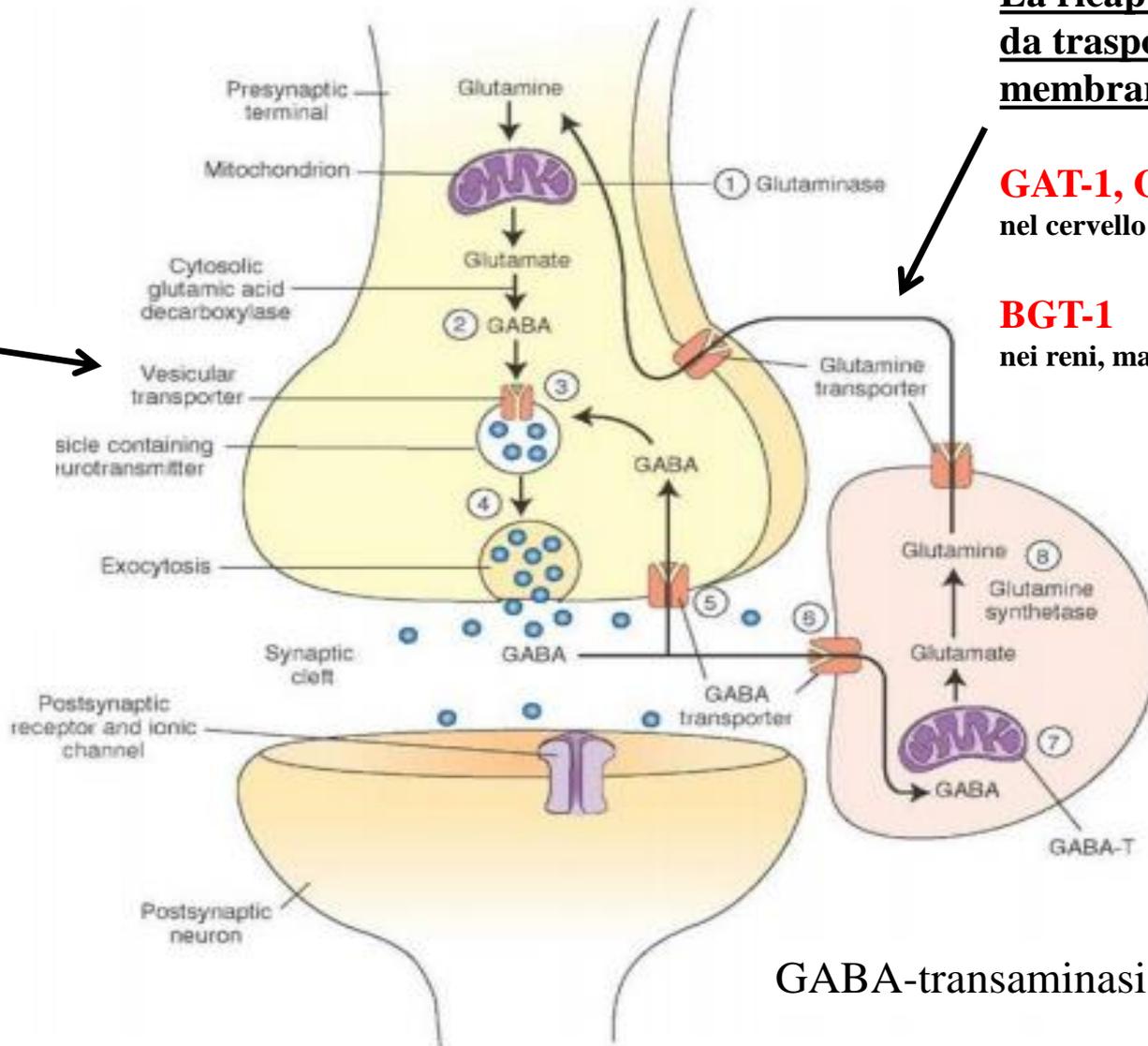
Il **GABA** è il **neurotrasmettitore inibitorio** più diffuso nel cervello (nel 30-40% di tutte le sinapsi) e si forma per **decarbossilazione dell'acido glutammico** (o **glutammato**), reazione catalizzata dalla **Glutammato decarbossilasi (GAD)**.



**Glutamic Acid  
Decarboxylase  
(GAD)**



# SINTESI E RILASCIO DEL GABA



La ricaptazione è mediata da trasportatori di membrana:

**GAT-1, GAT-2, GAT-3**  
nel cervello

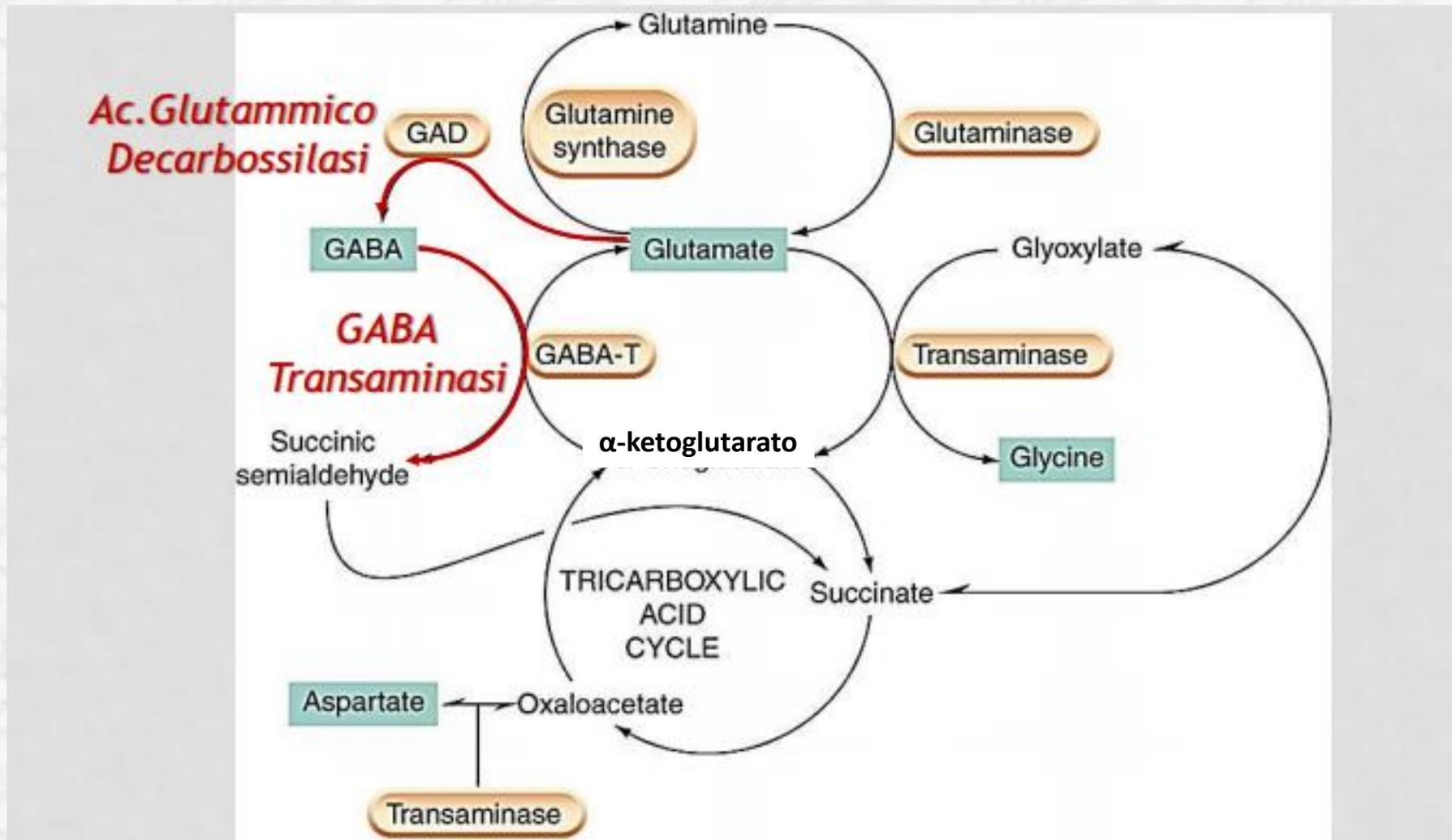
**BGT-1**  
nei reni, ma anche nel cervello

Cellula gliale

GABA-transaminasi (**GABA-T**)

il GABA è immagazzinato nelle vescicole presinaptiche → ad opera di **VIATT**

Il processo di degradazione avviene tramite l'enzima GABA-transaminasi (**GABA-T**) che deammina il GABA a semialdeide succinica a sua volta ossidata ad acido succinico ed entra nel ciclo di Krebs



# DISTRIBUZIONE DEL GABA

- Ampiamente distribuito in tutto il neurone.
- Prevalentemente interneuroni ad assoni brevi.
- Spesso co-rilasciato con altri trasmettitori.

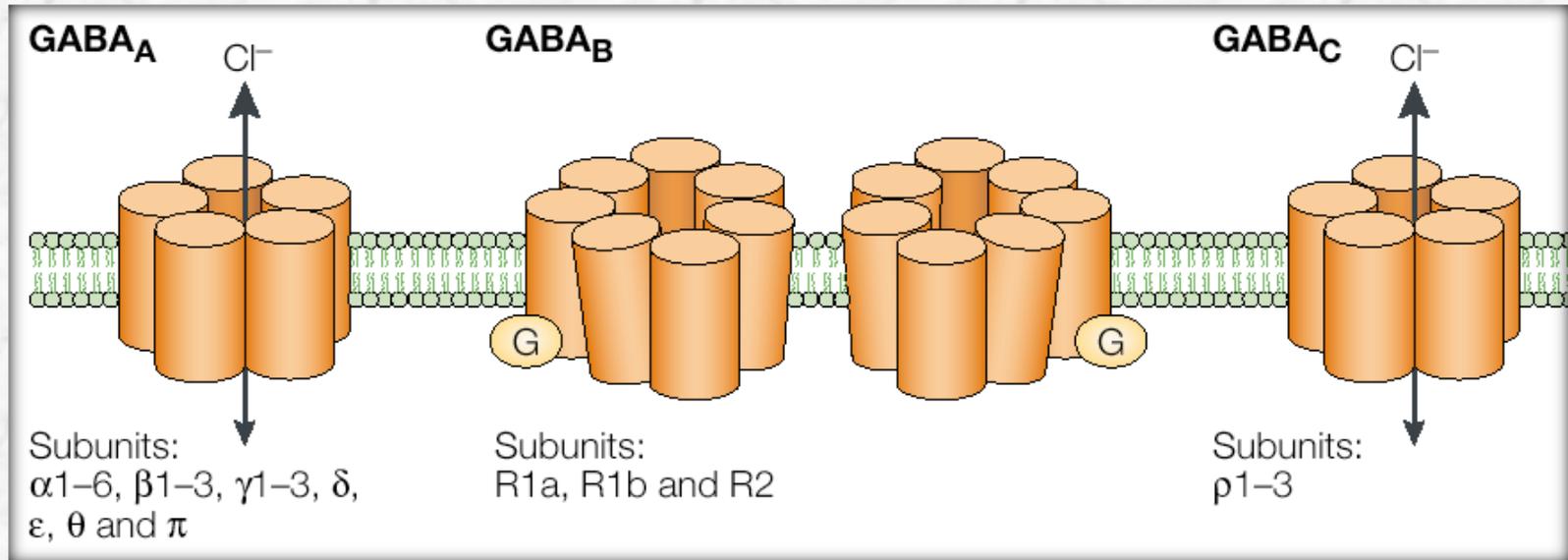
E' presente nel citoplasma delle terminazioni nervose ed è molto importante **per la neurotrasmissione inibitoria.**

Svolge un ruolo rilevante nel controllo di diverse funzioni cerebrali e risulta quindi essere coinvolto anche nella fisiopatologia di numerose **malattie neurologiche**

# 3 categorie di recettori per il GABA:

---

**GABA-A**  
**GABA-B**  
**GABA-C**

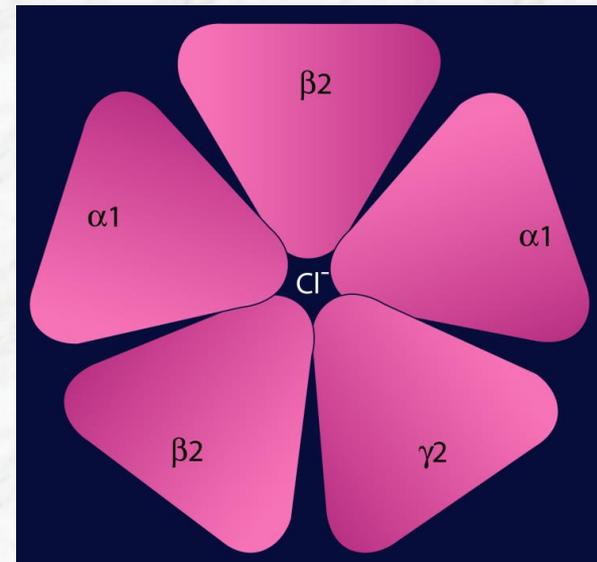
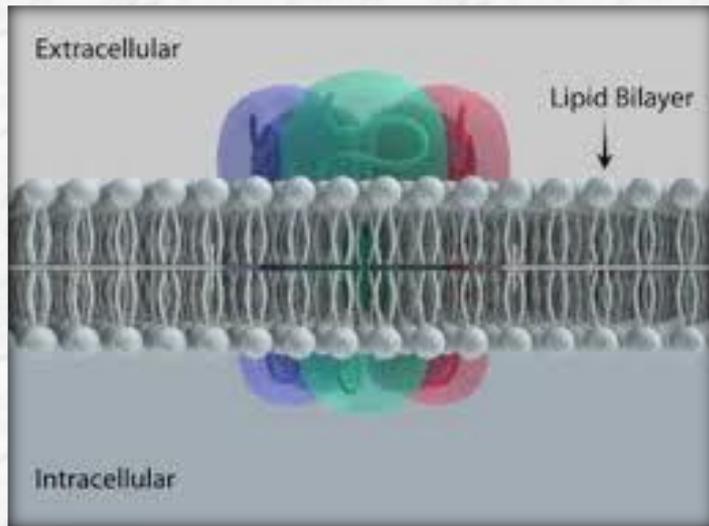


Recettori  $\text{GABA}_A =$  *mediano l'azione inibitoria veloce*

Recettori canale permeabili agli ioni  $\text{Cl}^-$ , la loro attivazione riduce l'eccitabilità neuronale mediante iper-polarizzazione del neurone

Pentameri costituiti da almeno 3 tipologie differenti di subunità glicoproteiche

$\alpha - \beta - \gamma$



---

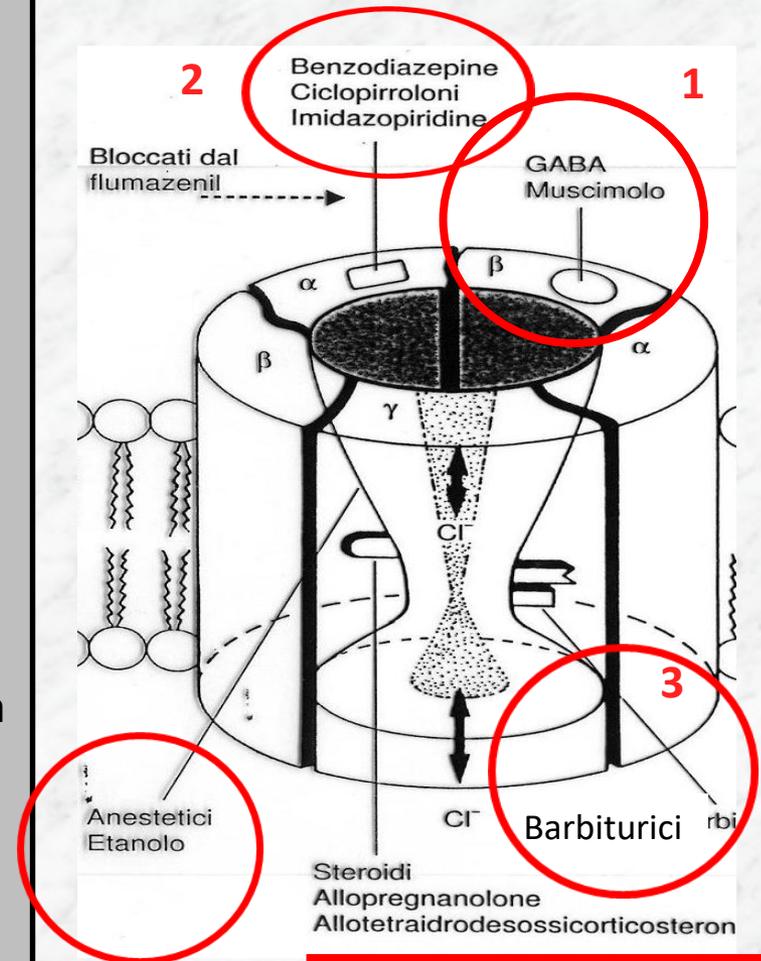
La struttura più comune è:  $(\alpha 1)_2 (\beta 2)_2 \gamma 2$

# Siti di legame sui Recettori GABA<sub>A</sub>

- 1) Sito di legame per il GABA, lega anche i GABA mimetici (muscimolo) e GABA-antagonisti (bicucullina) → si trova **sulla subunità β**
- 2) Sito per le BZD (aumentano la frequenza di apertura) è riconosciuto anche da agonisti inversi (β-carboline) ed antagonisti (flumazenil) → si trova **sulla subunità α**
- 3) Sito per i barbiturici (aumentano la durata di apertura) e per il loro antagonista picrotossina (usata contro avvelenamento da barbiturici) → si trova all'interno del canale

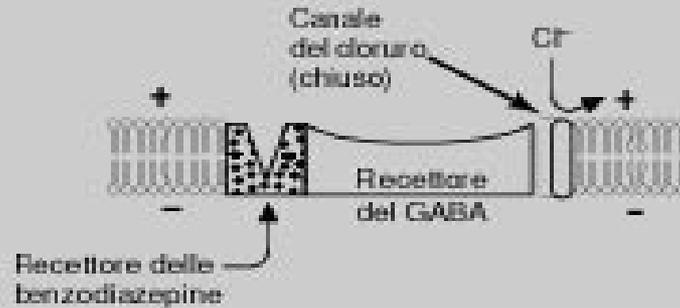
All' interno del canale:

Sito di legame per l'etanolo e per molti anestetici generali e anche per gli steroidi



# Modulazione da parte delle BDZ: modulatore allosterico positivo x il GABA

## A Recettore vuoto (assenza di agonisti)



Il recettore vuoto è inattivo e il canale del cloruro a esso accoppiato è chiuso

## B Legame al recettore del GABA



Il legame del GABA causa l'apertura del canale del cloruro

## C Legame al recettore del GABA e della benzodiazepina



Il legame del GABA è potenziato dalla benzodiazepina e ciò porta a una maggiore entrata di ioni cloruro

L'entrata di Cl<sup>-</sup> iperpolarizza la cellula rendendone più difficile la depolarizzazione e perciò riduce l'eccitabilità neuronale

# Nota importante sulle BDZ

---

**Uso** = si intende il consumo a seguito della **somministrazione corretta del farmaco**, per un periodo limitato e a una determinata posologia. Inoltre la **corretta prescrizione richiede anche la scelta di una BDZ ad hoc**, tenendo conto delle differenze farmacocinetiche che caratterizzano le diverse molecole (es. tipo di metabolismo = formazione o meno di metaboliti attivi ed emivita plasmatica).

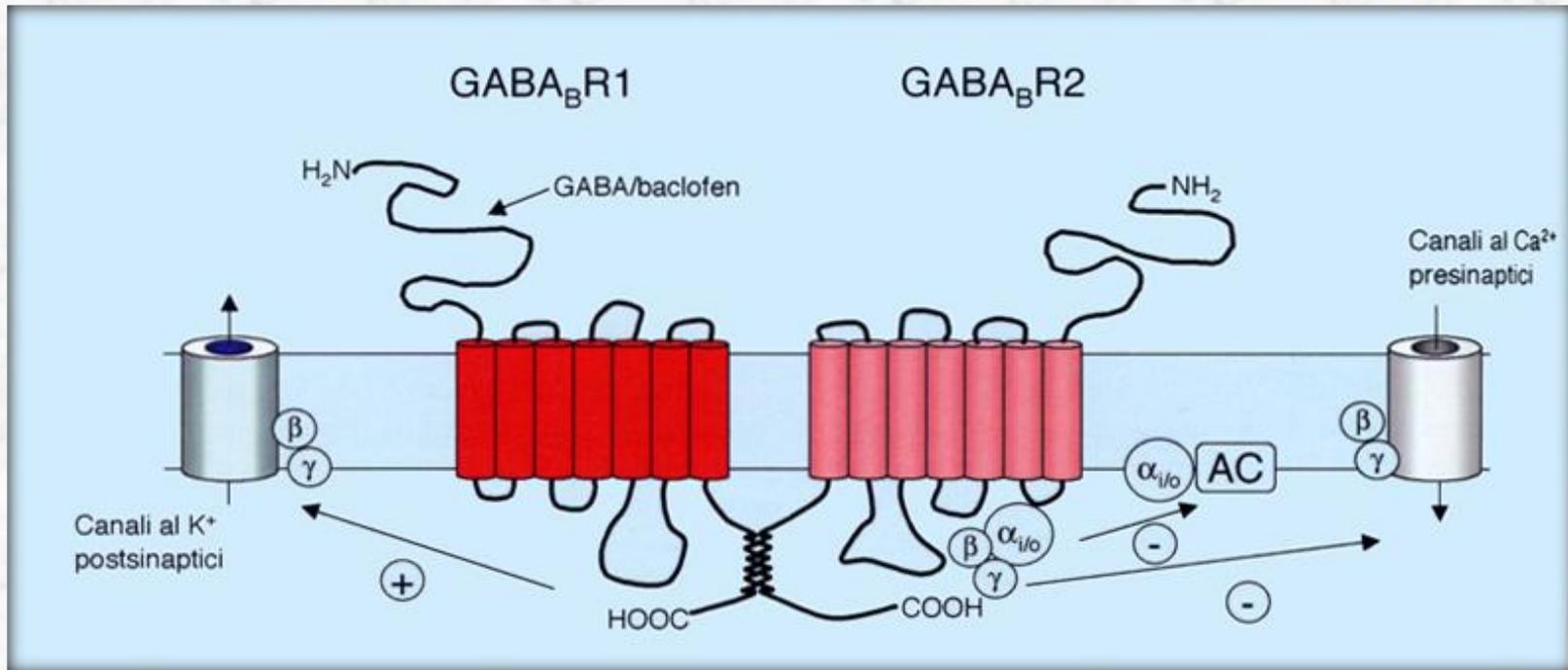
**Iper-uso** = si intende **l'uso eccessivo del farmaco per dosaggio e durata**. In esso si comprende il fenomeno dell'iperprescrizione e dell'automedicazione sotto "controllo" del medico. Avviene per diverse ragioni: 1) rapporto rischi / benefici a forte vantaggio dei secondi; 2) buona tollerabilità anche a lungo termine; 3) minime controindicazioni; 4) scarsa tossicità anche in soggetti anziani e in pazienti affetti da malattie croniche; 5) buona maneggevolezza e/o associabilità; 6) basso costo.

**Uso improprio o Misuse** = **l'utilizzo erraneo o inadeguato rispetto al soggetto** (es. pazienti predisposti all'abuso/dipendenza).

**Abuso** = l'uso di sedativi in condizione di poli-abuso/dipendenza, per combattere sintomi di astinenza o per aumentare o smorzare gli effetti di altre sostanze d'abuso.

# Recettori $GABA_B$ = mediano l'inibizione sinaptica lenta

*Eterodimeri costituiti da due glicoproteine*



- Il GABA e gli agonisti legano la regione N-terminale della porzione B-R1
- La porzione B-R2 è responsabile dell'accoppiamento a proteina G

Rec. 7DTM  
accoppiato a  
Prot.  $G_{i/o}$

Inibizione  
Adenilato  
Ciclastasi

↓ cAMP

Controllo inibitorio  
presinaptico sul rilascio di  
neurotrasmettitori

**La biosintesi di queste due glicoproteine è dipendente da due geni diversi  
(*GAB-BR1* e *GAB-BR2*),**

che danno luogo a 2 distinti prodotti a 7 Domini TM,

Successivamente alla sintesi avviene la migrazione e l' inserimento a livello della membrana

..... **A DIFFERENZA DEI RECETTORI GABA-A**

- 
- ✓ non modulati dalle BZD e dai BARBITURICI
  - ✓ non funzionalmente associati al canale del Cl
  - ✓ insensibili all'azione della bicucullina (antagonista) e GABA-mimetici
-

## ***Agonisti dei rec. GABA-B***

---

### **BACLOFEN = miorilassante ad azione centrale**

- nel trattamento delle **sindromi di tipo spastico** specialmente se causate da lesioni del del midollo spinale ad eziologia infettiva, degenerativa, traumatica, neoplastica o ignota
- nel trattamento della **sclerosi multipla, sclerosi laterale amiotrofica, neuropatia periferica**
- usato anche nel **trattamento dell'alcolismo (riduce il consumo = effetto anti-craving)**  
(approvato in Francia)

**La sospensione può causare sindrome d'astinenza simile a quella delle BDZ (ridurre gradualmente il dosaggio)**

## ***Antagonisti dei rec. GABA-B***

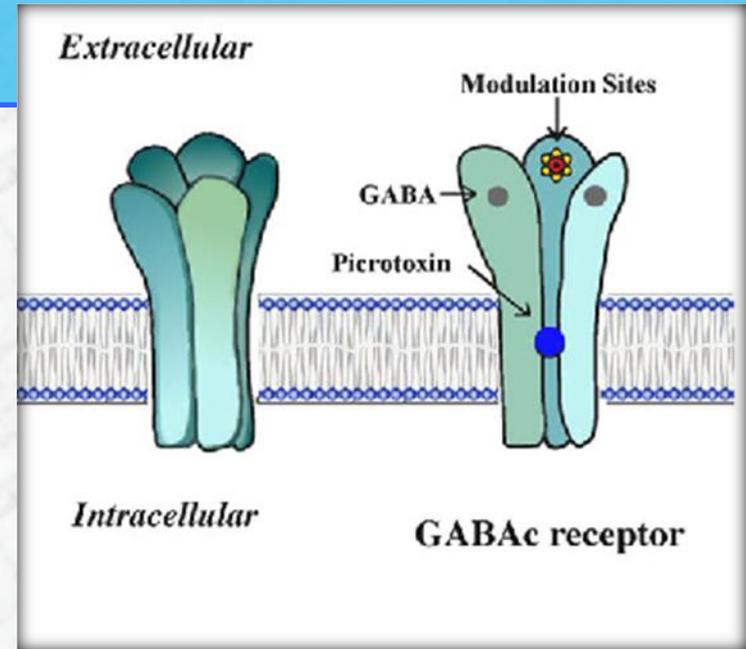
---

### ***Potenziati utilizzi***

- potrebbero **migliorare i processi cognitivi e la memoria e avere effetto positivo sulle crisi epilettiche**
- **possibile effetto antidepressivo**: trattamento cronico con antidepressivi aumenta i siti di legame dei recettori GABA<sub>B</sub> in varie aree del SNC.

# Recettori $\text{GABA}_c$

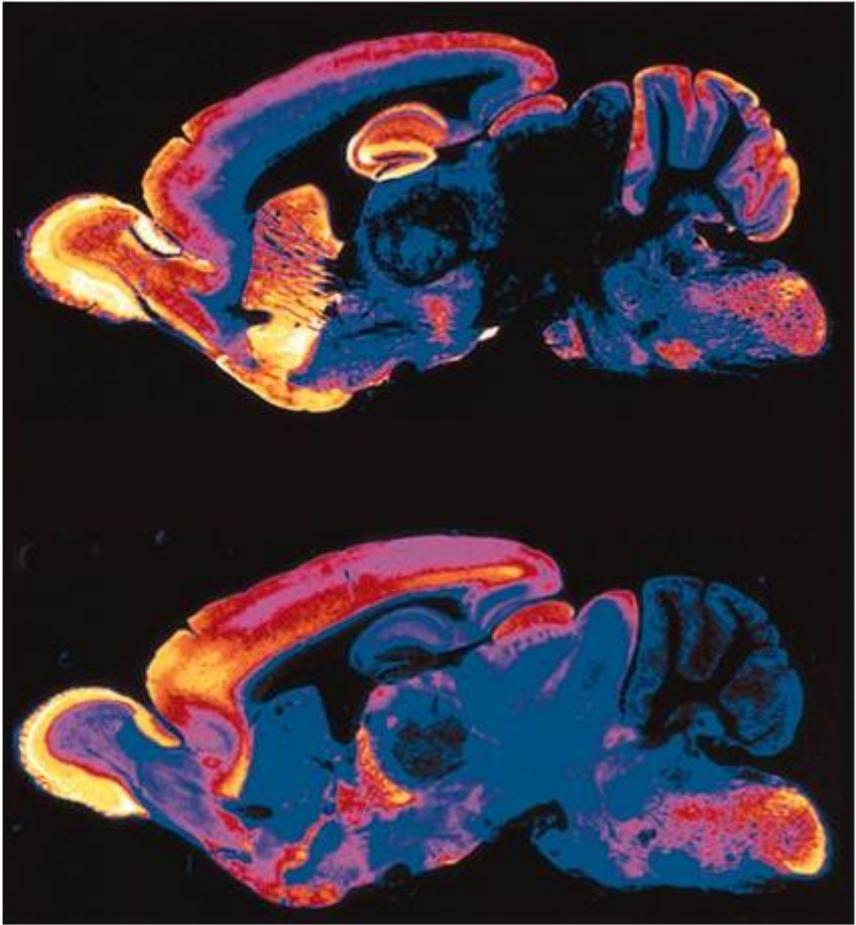
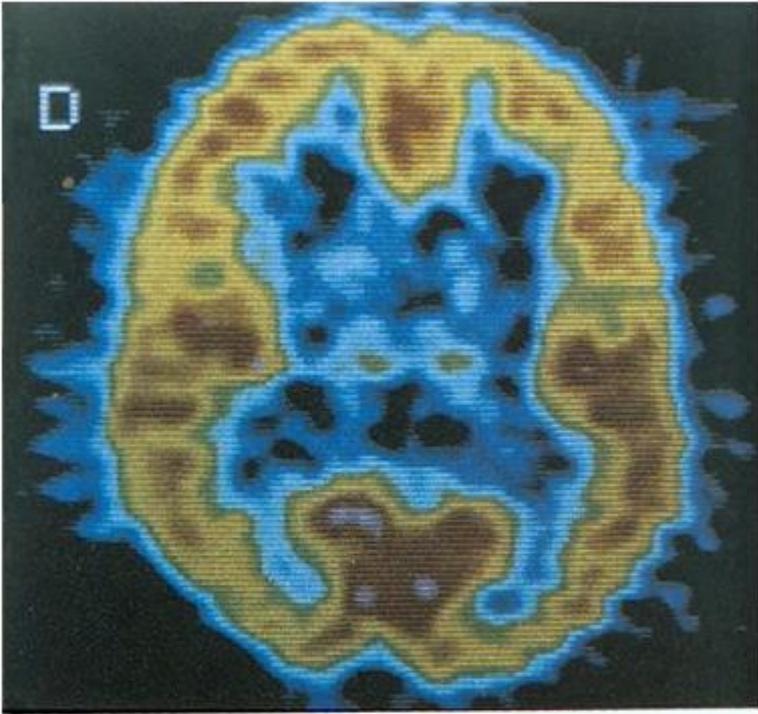
Espressi in molte aree cerebrali  
in concentrazioni  
particolarmente elevate nella retina



E' un **recettore canale per il Cloro; formato per oligomerizzazione di 5 subunità**

- si attivano e disattivano **molto più lentamente dei GABA-A**
- **insensibili a bicucullina (antag GABA<sub>A</sub>), a baclofen e saclofen (agon e antag GABA<sub>B</sub>) e anche a BZD, BARB e neurosteroidi**

# GABA RECEPTOR DISTRIBUTION IN HUMAN BRAIN



# GAMMA IDROSSI BUTIRRATO (GHB) = metabolita del GABA inibisce funzioni cerebrali

---

- ❑ Nel 1960 iniziale impiego come anestetico (scarsi effetti depressivi per il cuore e per il respiro) ma poco utile in anestesia per le sue scarse capacità analgesiche e per il rischio di indurre convulsioni.
- ❑ Nella forma **farmaceutica “ALCOVER”** è usato per il controllo della sindrome di astinenza da alcool perché in grado di riprodurre gli effetti gratificanti → agirebbe sui rec GABAB dimostravano che il GHB sopprimeva il consumo volontario di alcool etilico e la crisi d'astinenza nei ratti alcolisti (Prof. Gessa '80) → TERAPIA SOSTITUTIVA
- ❑ Come sostanza d'abuso si trova sul mercato clandestino sotto forma di polvere, capsule o, più frequentemente, come liquido incolore dal gusto salato causando: *droga “dello stupro”*

Sedazione, Amnesia,

Aumento degli stadi 3-4 del sonno,

Euforia/disinibizione, Convulsioni, Coma

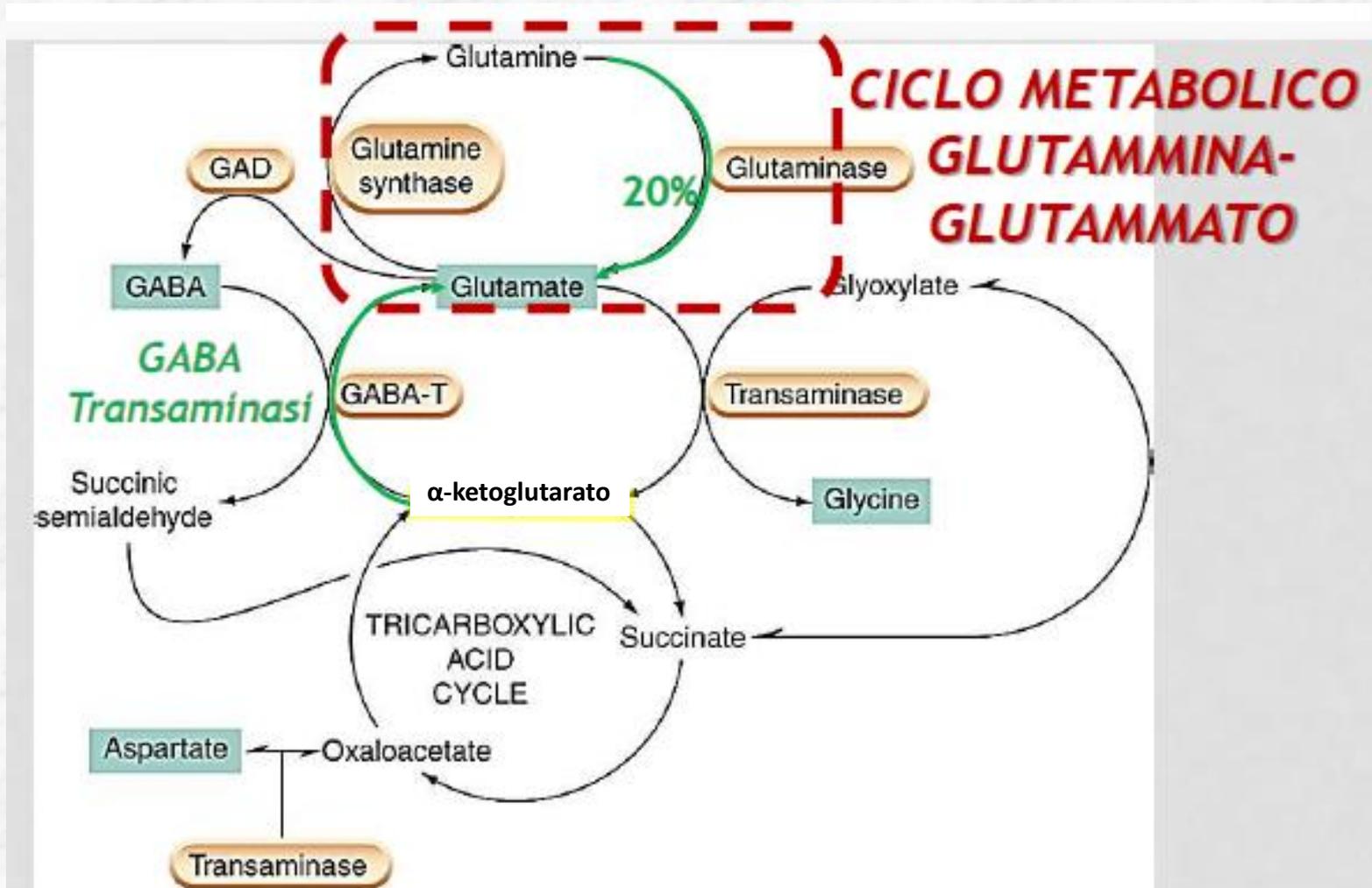
- Una esposizione massiccia può provocare psicosi, ansia, tachicardia, sudorazione, allucinazioni, SINDROME DI ASTINENZA

# **SISTEMA GLUTAMATERGICO**

**Il Glutammato (GLU) è il neurotrasmettitore eccitatorio più diffuso nel SNC, presente sia nei neuroni che nelle cellule Gliali e negli astrociti; è il precursore del GABA**

## 2 POSSIBILI VIE BIOSINTETICHE

1. dalla glicolisi e dal successivo ciclo di krebs si forma l'alfa-chetoglutarato che per aggiunta di un gruppo amminico forma il GLU
2. per deaminazione della glutammina (**ENZIMA GLUTAMINASI**)

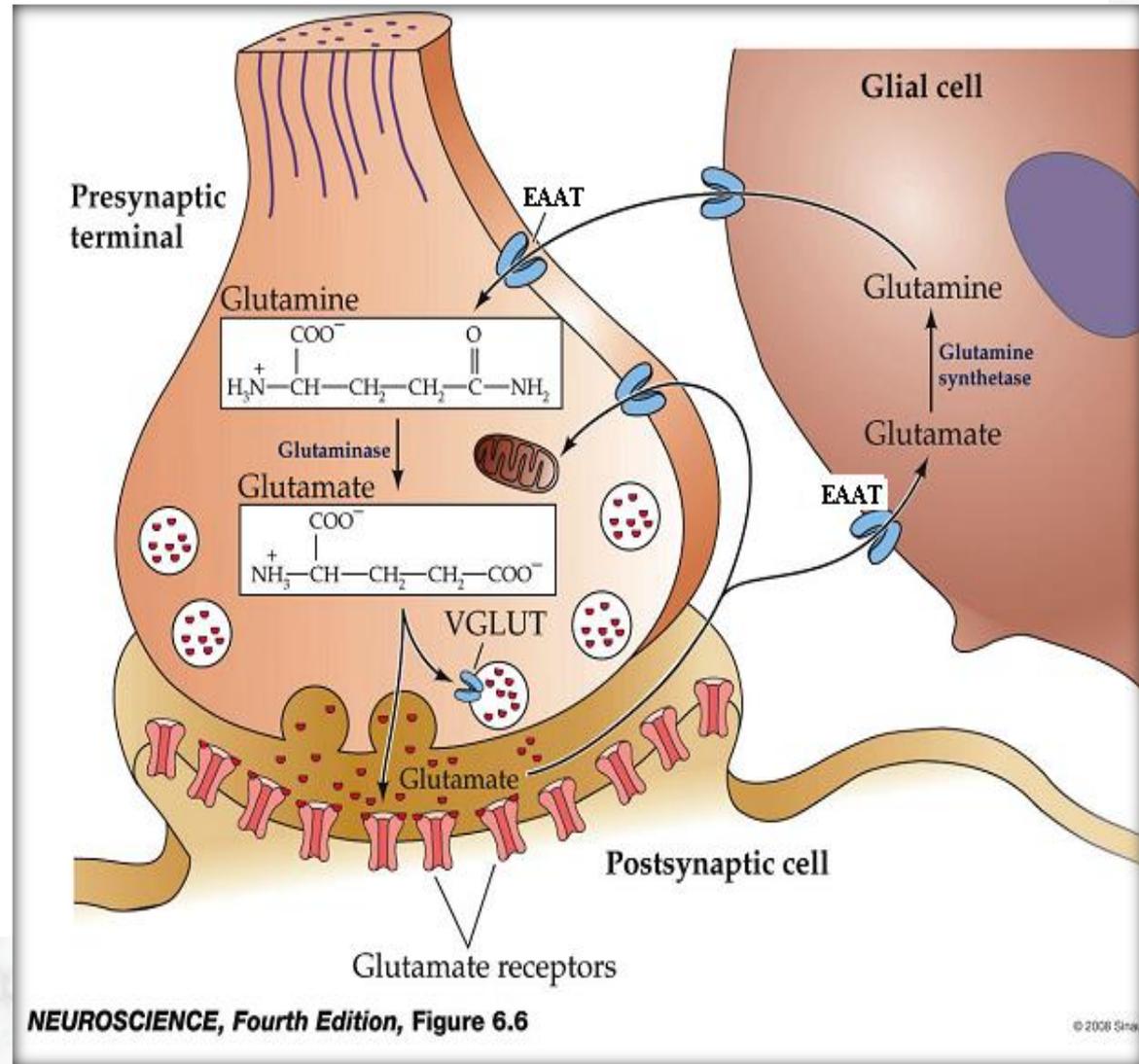


Una volta all'interno dei neuroni il GLU viene immagazzinato nelle vescicole sinaptiche ad opera di un altro trasportatore molto selettivo:

## Vesicular Glutamate Transporter [VGLUT]

Inoltre sono stati identificati 5 cDNA che codificano per proteine che trasportano GLU dall'esterno all'interno della cellula (ricaptazione):

## Excitatory Amino Acid Transporters [EAAT 1-5]



Il GLU può attivare:

3 tipi di recettori-canale (recettori ionotropi)  
1 tipo di recettore associato a proteine G  
(recettori metabotropi)

## Recettori Ionotropi:

Sono di 3 tipi sulla base della diversa sensibilità ad agenti farmacologici:

AMPA, N-methyl d-aspartate (NMDA) e kainato  
→ hanno tutti localizzaz. post-sinaptica

Receptor	AMPA	NMDA	Kainate
Subunits (combination of 4 or 5 required for each receptor type)	Glu R1	NR1	Glu R5
	Glu R2	NR2A	Glu R6
	Glu R3	NR2B	Glu R7
	Glu R4	NR2C	KA1
			NR2D

**AMPA**: omotetrameri assemblati dalle subunità **Glu R 1-4**  
Sono alla base delle risposte eccitatorie velocissime (depolarizz. rapide nelle sinapsi eccitatorie)

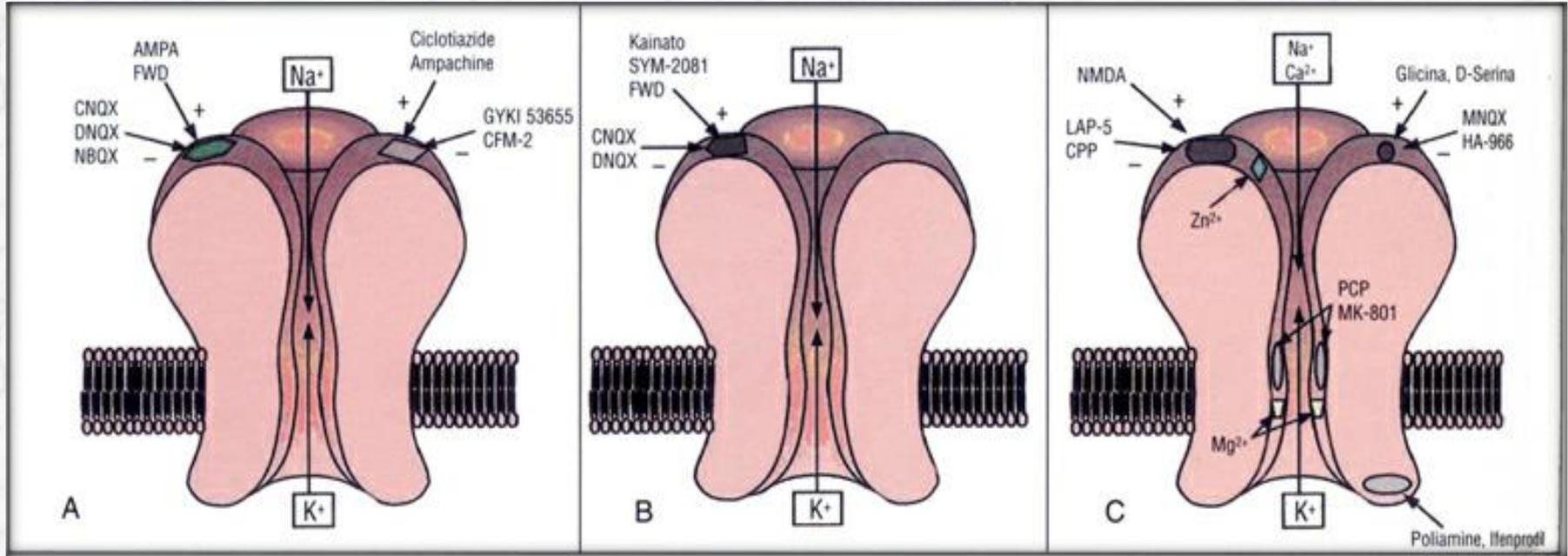
**NMDA**: eterotetrameri che contengono una subunità **NR1**, e subunità della famiglia **NR2**

**Kainato**: eterotetrameri contenenti subunità dalla famiglia **KA1,2** e dalla famiglia **Glu R 5-6-7**  
Mediano correnti che si desensitizzano rapidamente

**AMPA:** Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>

**Kainato:** Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>

**NMDA:** Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>

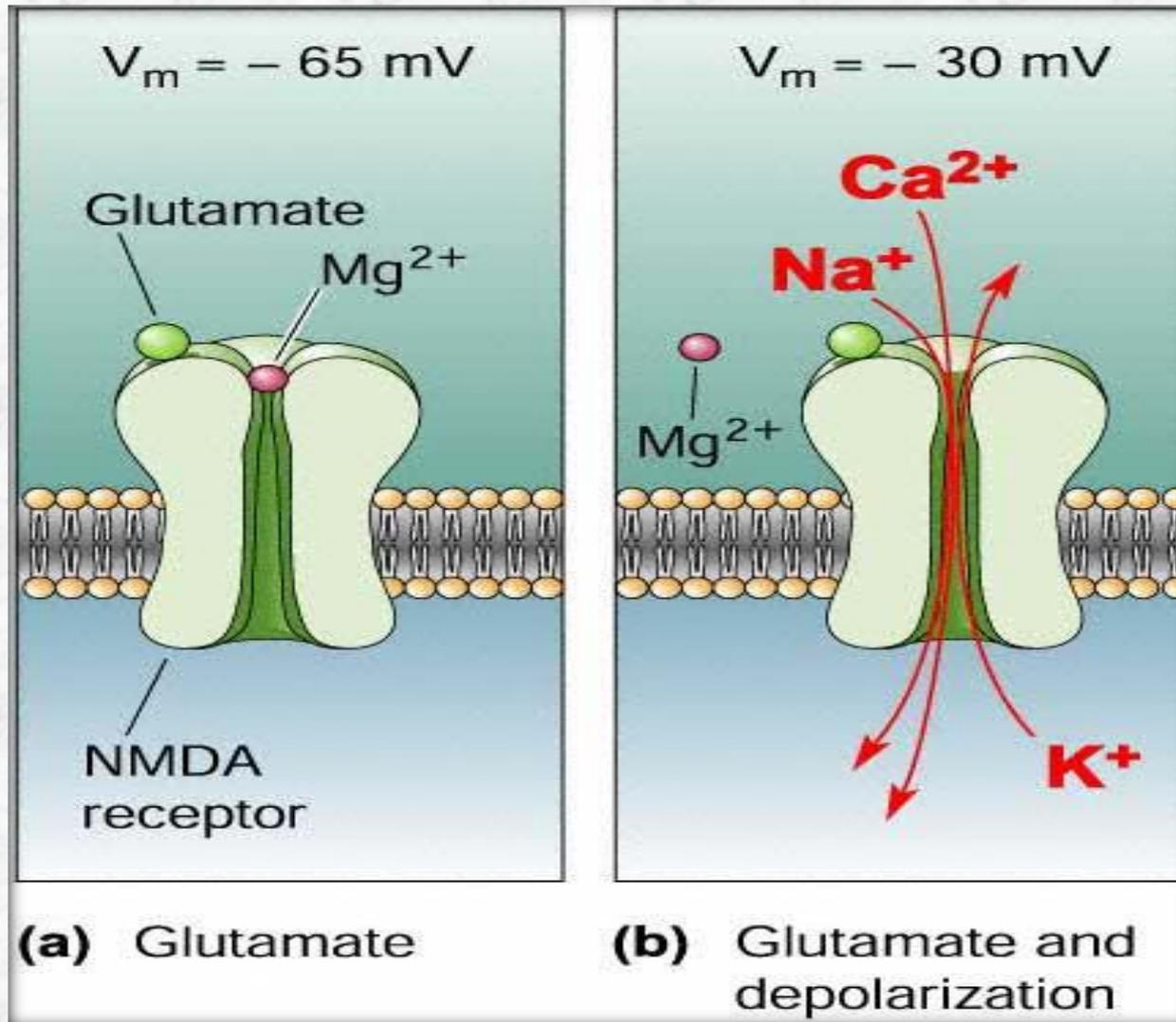


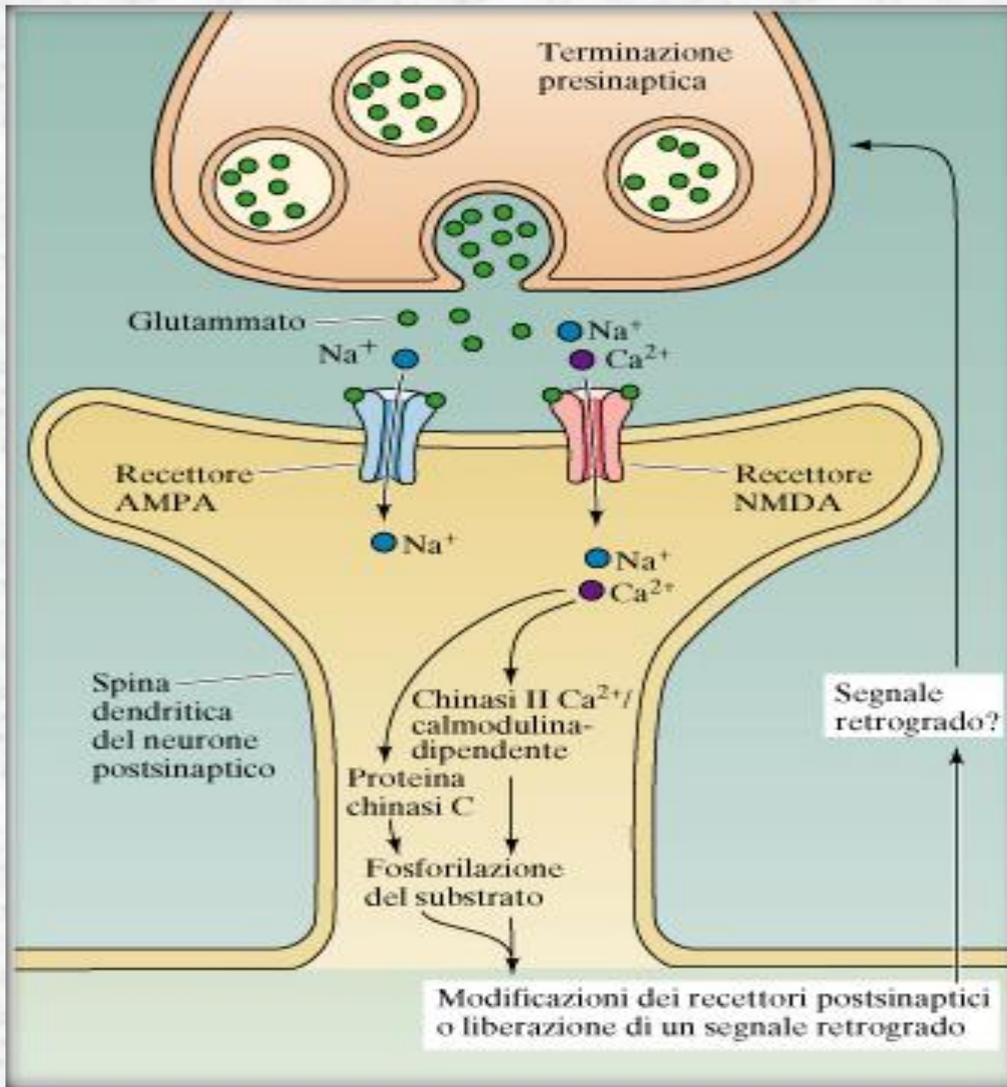
**Differenza sostanziale non-NMDA e NMDA :**

si aprono ogni volta che il GLU si lega

richiedono anche l'aumento della carica elettrica all'interno della cellula.

I recettori NMDA sono bloccati dagli ioni  $Mg^{2+}$   
in maniera voltaggio-dipendente

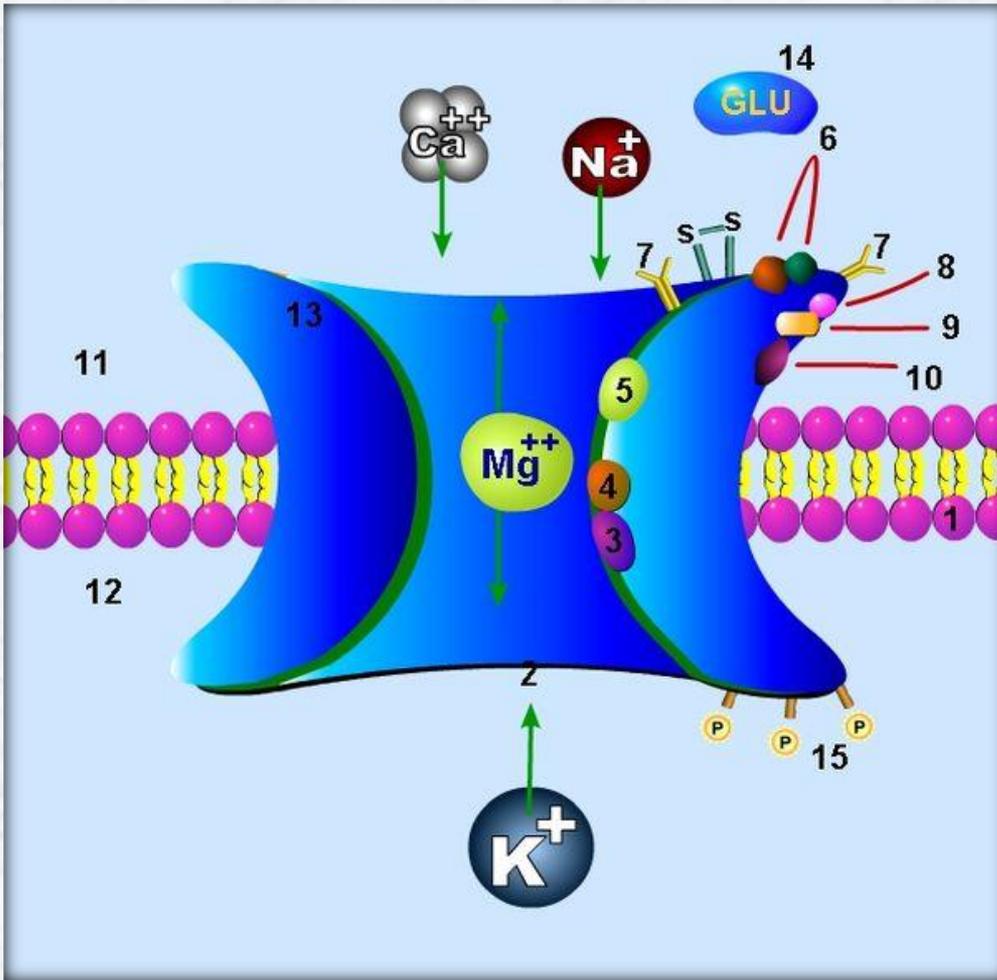




- l'ingresso di  $\text{Na}^+$  tramite AMPA provoca depolarizzazione della membrana ed **allontanamento degli ioni  $\text{Mg}^{2+}$**  dagli NMDA

- ciò permette anche al  $\text{Ca}^{2+}$  di entrare ed di agire come secondo messaggero **attivando delle proteine chinasi** che inducono e **producono un messaggero retrogrado** che, a livello presinaptico, causa un ulteriore aumento della liberazione di glutammato

→ **effetto potenziante a feedback positivo che induce **plasticità sinaptica**** → può essere a lungo (LTP) o a breve termine (STP)



## PRINCIPALI SITI DI LEGAME SUL REC. NMDA

- 2- canale ionico
- 4- sito di leg. per il  $Mg^{++}$
- 5- sito di leg. per lo  $Zn^{++}$
- 6- sito di leg. per gli agonisti/antag
- 7- siti di glicosilazione
- 9- sito di leg. per la glicina (inibitorio)
- 10- sito di leg. per le poliammine

La glicina potenzia l'affinità del GLU al proprio recettore ed è priva di attività intrinseca (**agonista allosterico**)

# Farmacologia dei recettori ionotropi

---

## AGONISTI

NMDA → glutammato, NMDA, aspartato

AMPA → glutammato, AMPA

KAINATO → glutammato, acido kainico

• **Eccitotossicità**: conc elevate di glutammato provoca **sovraattivazione dei recettori NMDA** e un grande aumento della concentrazione di Ca libero

→ **ciò innesca una serie di meccanismi tossici** (attivazione delle proteasi, formazione di radicali tossici, danno mitocondriale ecc.), che **portano a morte cellulare e necrosi della zona colpita = CELLULE ISCHEMICHE**

Uso di **ANTAGONISTI** ancora poco soddisfacente

- Sembra che l'alterazione della trasmissione eccitatoria mediata dal glutammato potrebbe essere coinvolta anche nell'eziologia dell'epilessia.

Anche in questo caso, tuttavia, gli antagonisti del glutammato non sono risultati efficaci in clinica, anche perché le dosi attive provocano gravi effetti collaterali (incoordinazione motoria).

- Modelli di learning and memory hanno implicato i recettori NMDA come un fattore rilevante

# 1- ANTAGONISTI NMDA

→ da anni utilizzati in clinica come anestetici

Es. **KETAMINA** è un bloccante del complesso recettore NMDA-Ca<sup>++</sup>

✓ la **MEMANTINA**, ha un favorevole rapporto rischio/beneficio nel ridurre la progressione della demenza di Alzheimer

✓ poiché la GLICINA partecipa all'attivazione del recettore NMDA, il blocco del sito della glicina fornisce un'alternativa agli antagonisti recettoriali → **ACIDO KINURENICO** o **ACIDO 7-CLOROKINURENICO**

✓ Mg <sup>++</sup> per il suo ruolo di blocco del canale

# **L'ACIDO KINURENICO (KYNA)**

Agisce come antagonista sia dei recettori nicotinici (nAChRs) che di quelli del glutammato (NMDA), che giocano entrambi un ruolo centrale nel determinare la plasticità neurale così e nel **regolare le attività di apprendimento e di memorizzazione** .

***Può predisporre a deficit della memoria***

→ un aumento della concentrazione di KYNA comporta deficit significativi nelle capacità di apprendimento visuo-spaziale dei ratti , andando a compromettere la sensibilità sensoriale e il controllo degli impulsi.

Diversi studi hanno dimostrato che i **livelli di KYNA sono elevati** nel cervello e nel liquido cefalorachidiano delle **persone con schizofrenia** dimostrando che cambiamenti nella concentrazione di KYNA possono **contribuire alle disfunzioni a livello cognitivo caratteristiche della schizofrenia.**

## 2- ANTAGONISTI AMPA

ANTAG. COMPETITIVI (CNQX, DNQX) e non-COMPETITIVI(GYKI-52466)

In preclinica è stato osservato che **possono essere in grado di prevenire la perdita di neuroni ippocampali causata da episodi di ischemia** e sono stati anche proposti come capaci di **prevenire il danno cerebrale che segue l'arresto cardiaco, contro le crisi epilettiche**

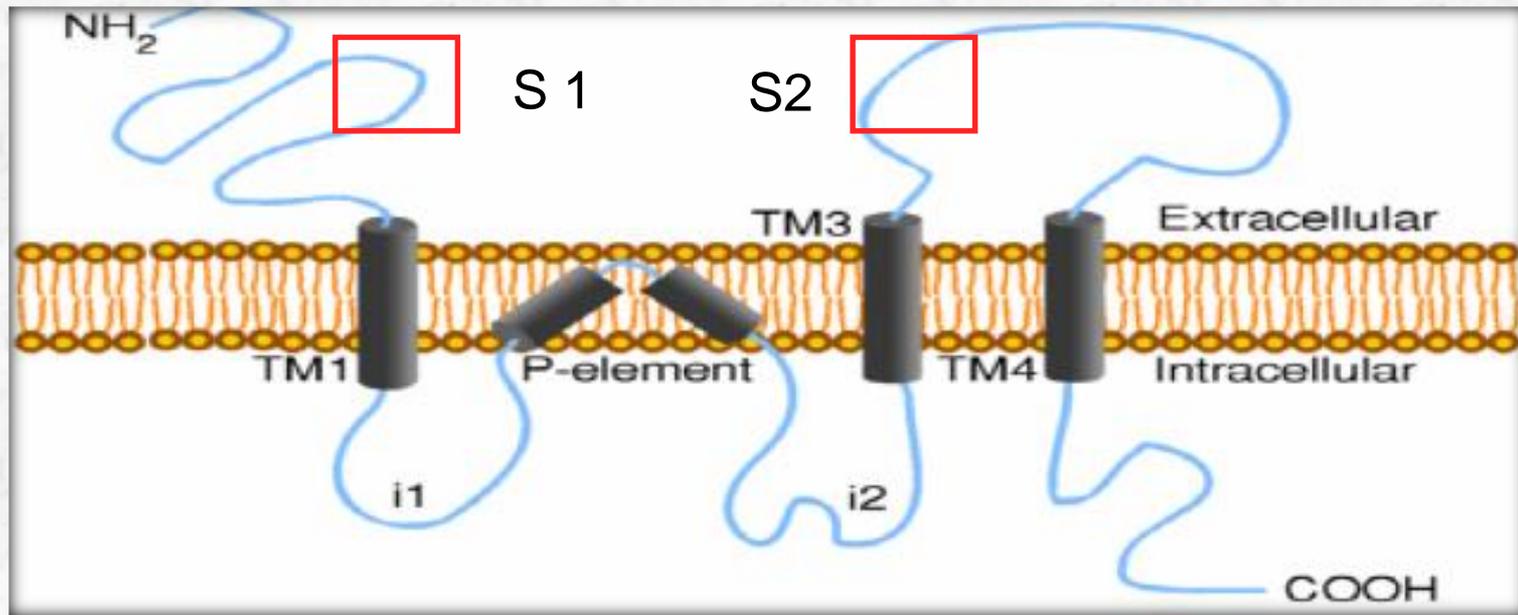
*ma gravi effetti collaterali* (danni ai tubuli renali)

## 3- ANTAGONISTI KAINATO

 (CNQX) possono modulare il rilascio di GLU e GABA

# Recettori MAETABOTROPICI: mGLU-R

A livello extracellulare troviamo 2 domini che formano il sito di legame del GLU (**S1** ed **S2**)  
4 domini lipofili: 3 attraversano la membrana plasmatica (**M1, M3, M4**) e 1 si inserisce ad ansa nella membrana stessa (**M2**)



**mGLU R1-5**  
(prot Gq)

**mGLU R2-3**  
(prot Gi/o)

**mGLU R4-6-7-8**  
(prot Gi/o)

**mGLU R1-5 →**



**Localizzaz. Post sinaptica**

sono Rec. di tipo eccitatorio in quanto agiscono come **modulatori + per il rilascio del GLU** (aumentando la fosforilaz. di NMDA/AMPA) e **come modulatori – per il rilascio del GABA**

**Rafforzano la trasmissione glutammatergica** durante i fenomeni di plasticità (apprendimento, memoria e coordinazione motoria)

**Potenziano la funzione dei recettori ionotropici del glutammato** sia con meccanismo mediato dalla protein-chinasi C (rimozione del blocco da magnesio dei recettori NMDA) che attivando tirosin-chinasi non recettoriali della famiglia Src, che determinano un'aumentata fosforilazione del recettore NMDA e del recettore AMPA, potenziandone così le correnti.

**ANTAGONISTA → mGluR1 (di tipo eccitat.) in fase di valutazione preclinica per l'ischemia cerebrale**

## mGLU R2-3 →

### Localizzaz. Pre-sinaptica

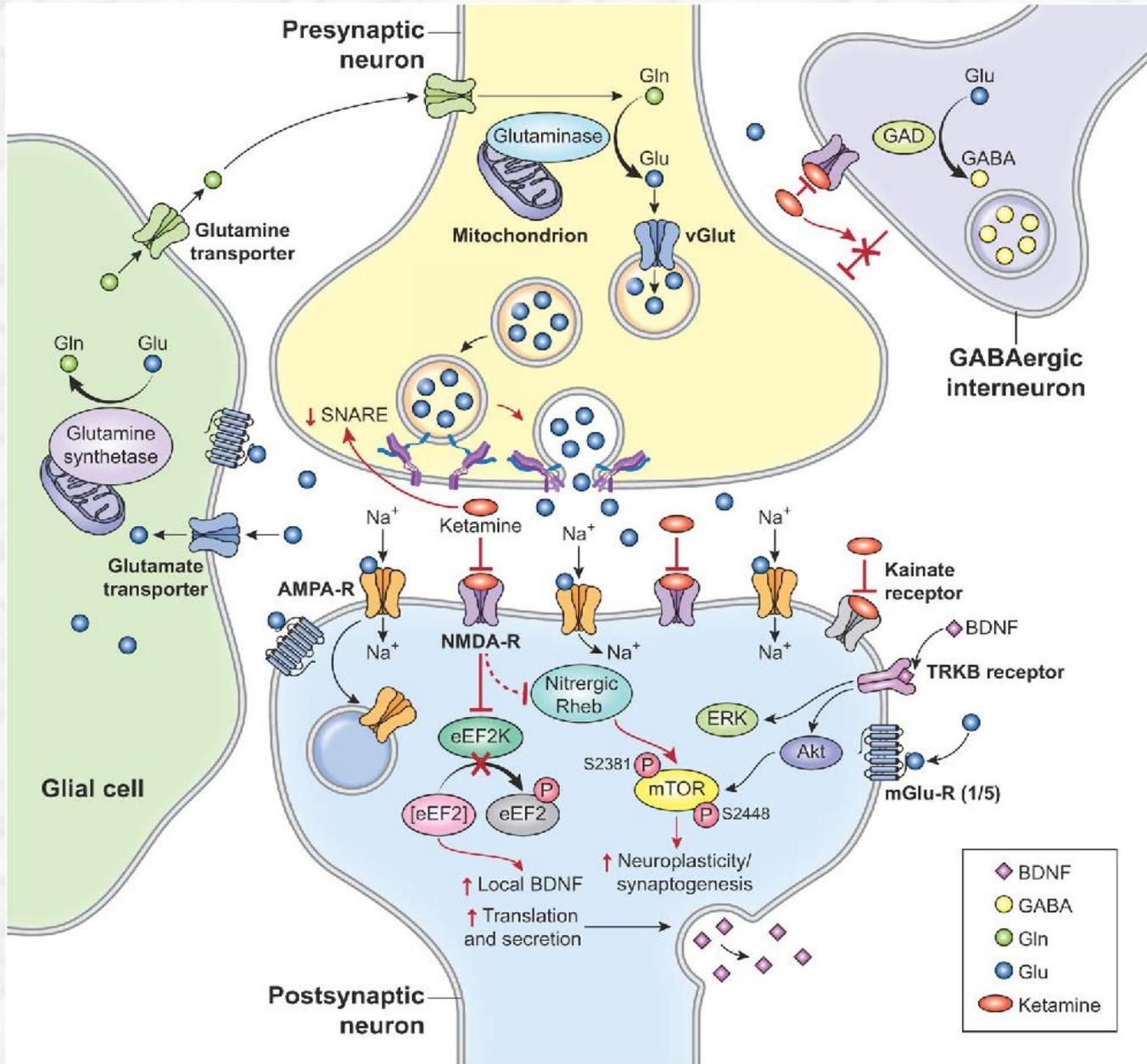
sono Rec. di tipo inibitorio in quanto modulatori – del rilascio del GLU → riducendone il rilascio solo durante i processi di iper-eccitabilità neuronale

**Agonisti mGluR2/3 (di tipo inibit.)** sono in corso di studio per testarne l'attività ansiolitica

## mGLU R4,6,7,8 →

### Localizzaz. Pre-sinaptica

sono modulatori negativi del rilascio del GLU

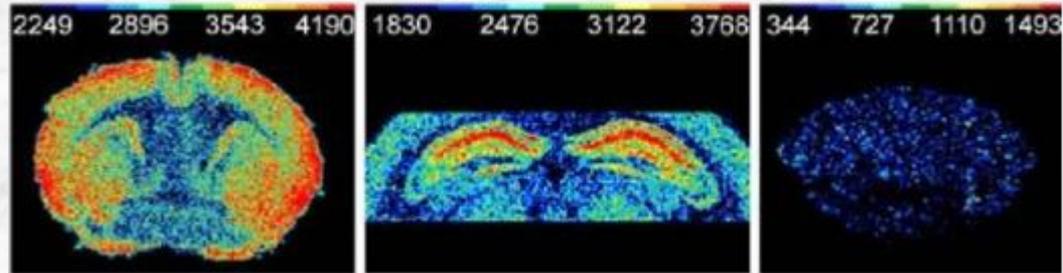


Caudate-putamen

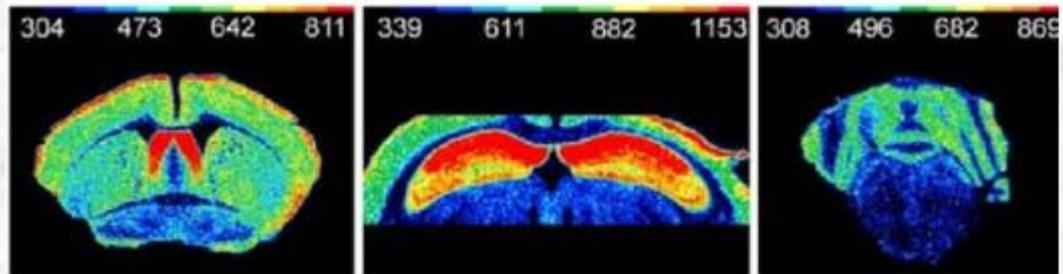
Hippocampus

Cerebellum

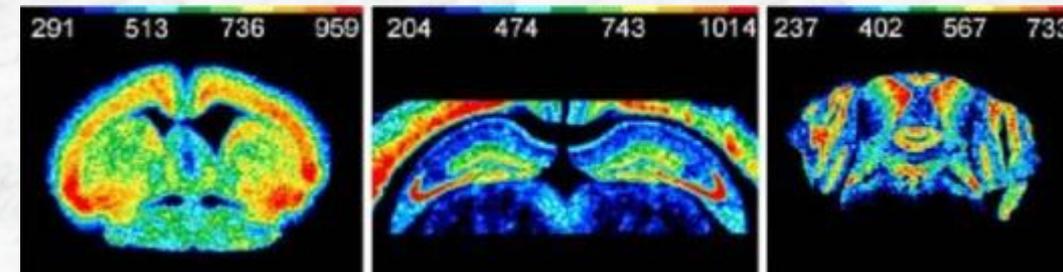
NMDA



AMPA



Kainate receptors



GABA-A

