

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO DI RICERCA INTERNAZIONALE IN SCIENZE FARMACEUTICHE
XXVIII CICLO
DIPARTIMENTO SCIENZE DEL FARMACO

ELISA ZUCCARELLO

PROGETTAZIONE E SINTESI DI LIGANDI IBRIDI SIGMA-NO
"LIGHT-ACTIVATED" A POTENZIALE ATTIVITA'
ANTIPROLIFERATIVA.

NIH 10495 E DERIVATI:
MODULAZIONE DELL'ATTIVITA' OPIOIDE, SIGMA-1 ED
HDAC NEL DOLORE NEUROPATICO.

TESI DI DOTTORATO

Tutor:
Chiar.mo Prof. A. Marrazzo

A. Marrazzo
Coordinatore:
Chiar.mo Prof. A. Marrazzo

E. Zuccarello

TRIENNIO ACCADEMICO 2012-2015



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

**DOTTORATO DI RICERCA INTERNAZIONALE IN SCIENZE FARMACEUTICHE
XXVIII CICLO
DIPARTIMENTO SCIENZE DEL FARMACO**

ELISA ZUCCARELLO

**PROGETTAZIONE E SINTESI DI LIGANDI IBRIDI SIGMA-NO
“LIGHT-ACTIVATED” A POTENZIALE ATTIVITA’
ANTIPROLIFERATIVA.**

**NIH 10495 E DERIVATI:
MODULAZIONE DELL’ATTIVITA’ OPPIOIDE, SIGMA-1 ED
HDAC NEL DOLORE NEUROPATICO.**

TESI DI DOTTORATO

**Tutor:
Chiar.mo Prof. A. Marrazzo**

**Coordinatore:
Chiar.mo Prof. A. Marrazzo**

TRIENNIO ACCADEMICO 2012-2015

INDICE

1.	PARTE 1: UNA POSSIBILE E INNOVATIVA TERAPIA ANTITUMORALE: RILASCIO “LIGHT-ACTIVATED” DI OSSIDO NITRICO.	
1.1	I MECCANISMI DI BASE DELLE PATOLOGIE TUMORALI	6
1.2	PATOGENESI DELLA MALATTIA	8
1.3	TERAPIA ANTITUMORALE	12
1.4	MULTI-DRUGS RESISTANCE (MDR)	22
1.5	CARATTERISTICHE E RUOLO FISIOLÓGICO OSSIDO NITRICO (NO)	23
1.6	RUOLO DELL’OSSIDO NITRICO NELLA PATOGENESI TUMORALE	28
1.7	COMPOSTI NO- <i>caged</i>	30
1.8	RILASCIO <i>IN VIVO</i> DI NO	34
1.9	LIGAND-TARGETED	38
1.10	RECETTORI SIGMA	41
1.11	RECETTORI SIGMA-1	43
1.12	RECETTORI SIGMA-2	47
1.13	RUOLO SOTTOTIPI RECETTORIALI σ_1 E σ_2 NELLA PATOGENESI TUMORALE	49
1.14	SCOPO DELLA RICERCA	52
2.	PARTE SPERIMENTALE	
2.1	MATERIALI E METODI	56
2.2	DISCUSSIONE CHIMICA	57
2.3	SEZIONE SPERIMENTALE	63
3.	PARTE 2: NIH 10495 E DERIVATI: MODULAZIONE DELL’ATTIVITA’ OPPIOIDE, SIGMA-1 ED HDAC NEL DOLORE NEUROPATICO.	
3.1	CLASSIFICAZIONE DEL DOLORE	81
3.2	IL DOLORE NEUROPATICO	84
3.3	MECCANISMI PERIFERICI	86
3.4	MECCANISMI CENTRALI	86
3.5	LA NOCICEZIONE	90
3.6	MODULAZIONE DEL DOLORE: LE VIE ASCENDENTI	92
3.7	MODULAZIONE DEL DOLORE: LE VIE DISCENDENTI	95
3.8	SISTEMA OPPIOIDE: CARATTERISTICHE GENERALI	97

3.9	PEPTIDI OPPIOIDI ENDOGENI	99
3.10	RECETTORI OPPIOIDI	102
3.11	RECETTORI μ	105
3.12	RECETTORI δ	108
3.13	RECETTORI κ	110
3.14	RUOLO DEI RECETTORI OPPIOIDI NELLA MODULAZIONE DELL'ANALGESIA	114
4.	MECCANISMI EPIGENETICI COINVOLTI NEL DOLORE	
4.1	MECCANISMI EPIGENETICI COINVOLTI NEL DOLORE CRONICO	118
4.2	ENZIMI ISTONE ACETILASI (HAT) E ISTONE DEACETILASI (HDAC)	120
4.3	CLASSIFICAZIONE HDAC	122
4.4	INIBITORI HDAC (HDACi)	123
4.5	RUOLO DEGLI HDACi NEL TRATTAMENTO DEL DOLORE NEUROPATICO	129
4.6	RUOLO DEL RECETTORE σ_1 NEL TRATTAMENTO DEL DOLORE NEUROPATICO	131
4.7	SCOPO DELLA RICERCA	135
5.	PARTE SPERIMENTALE	
5.1	MATERIALI E METODI	139
5.2	DISCUSSIONE CHIMICA	140
5.3	SEZIONE SPERIMENTALE	143
6.	BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	152

*A mio nonno Enzo
La distanza che ci separa non esiste, perché l'amore non muore mai.*

PARTE 1

MECCANISMI DI BASE DELLE PATOLOGIE TUMORALI

1.1 MECCANISMI DI BASE DELLE PATOLOGIE TUMORALI.

Negli ultimi anni si assiste, in seguito all'allungamento della vita media globale ed allo stile di vita sempre più sregolato, ad una costante crescita del numero di soggetti affetti da patologie neoplastiche. Secondo la World Health Organization (WHO) il cancro è una delle principali cause di morte nel mondo, con approssimativamente 14 milioni di nuovi casi e 8,2 milioni di decessi correlati ai tumori nel 2012; inoltre si prevede un aumento dei decessi del 70% nei prossimi due decenni. Tra gli uomini, le forme più comuni di neoplasie diagnosticate di recente sono: il tumore al polmone, allo stomaco, al colon-retto, al fegato e alla prostata. Tra le donne invece, i principali bersagli tumorali riguardano il seno, i polmoni e la cervice uterina. Tra tutte le neoplasie, le più comuni cause di morte sono rappresentate dal cancro al polmone (1,6 milioni di decessi), cancro al fegato (745.000 decessi), cancro allo stomaco (723.000 decessi), tumore al colon-retto (694.000 decessi), tumore alla mammella (521.000 decessi).

Il cancro viene definita una patologia multifattoriale, in quanto considerato come il risultato dell'interazione tra i fattori genetico/ambientali e le caratteristiche fisiologiche intrinseche della popolazione cellulare affetta. Tali fattori intrinseci possono includere la suscettibilità ad agenti cancerogeni, variazioni del metabolismo ossidativo e produzione di radicali liberi tossici da parte del metabolismo cellulare.

I fattori ambientali, che rappresentano l'agente eziologico dei tumori nel 90-95 % dei casi, vengono classificati in 3 categorie:

- 1) **agenti fisici**, come le radiazioni UV e ionizzanti (particelle alfa, beta e gamma);
- 2) **agenti chimici**, come gli idrocarburi ciclici aromatici (es. benzopirene) presenti nel fumo della sigaretta, l'alcool, l'aflatossina B1 (contaminante alimentare) e l'arsenico (contaminante dell'acqua potabile); e infine
- 3) **agenti biologici**, come le infezioni indotte da virus, batteri e parassiti.

L'uso di tabacco, consumo di alcol, dieta scorretta e inattività fisica sono i principali fattori di rischio di cancro in tutto il mondo. Alcune infezioni croniche sono fattori di rischio per il cancro: epatite B (HBV), il virus dell'epatite C (HCV) e alcuni tipi di virus del papilloma umano (HPV) che aumentano il rischio per il cancro al fegato ed il cancro alla cervice uterina, rispettivamente; mentre l'infezione da HIV aumenta notevolmente il rischio di cancro al collo dell'utero. Anche l'invecchiamento è un altro fattore fondamentale per lo sviluppo del cancro, probabilmente a causa della tendenza dei meccanismi di riparazione cellulare di essere meno efficaci con l'avanzare dell'età.¹ Inoltre, tra i fattori di rischio ambientali che contribuiscono alla mortalità da cancro annoveriamo l'obesità, l'inattività fisica e una scorretta alimentazione. L'eccesso di peso corporeo, infatti, è associabile a diverse tipologie di tumori, tra cui principalmente il cancro al seno, all'ovaio e al colon e rappresenta

un fattore presente in un valore compreso tra il 14 e il 20 % in tutte le morti per cancro negli Stati Uniti. Anche la mancanza di attività fisica è un importante fattore di rischio per lo sviluppo di tumori, non solo attraverso i suoi effetti sul peso corporeo, ma anche attraverso gli effetti negativi sul sistema immunitario e sul sistema endocrino. Infine, si ritiene che le diete ad alto contenuto di carni rosse o trasformate e a basso contenuto di frutta, verdura e cereali integrali siano responsabili della comparsa di vari tipi di tumori solidi.²

Più del 30% delle morti per cancro potrebbe essere prevenuto modificando o evitando fattori di rischio (**Fig. 1.1**), tra cui: l'uso del tabacco, essere in sovrappeso o obesi, dieta non sana a basso consumo di frutta e di verdura, mancanza di attività fisica, l'uso di alcol, infezioni da HPV a trasmissione sessuale, infezione da HBV, radiazioni ionizzanti e non ionizzanti, inquinamento atmosferico urbano.

Fattori rischio per tumori letali: paesi sviluppati (%)	Localizzazione di tumori														
	bocca e orofaringe	esofago	stomaco	colon e rectum	fegato	pancreas	trachea, bronchi, polmoni	mammelle	cervix uteri	corpus uteri	vescica	leucemia	diversi scelti	altri tumori	tutti tumori
Alcool	14	24			33			14					5		4
Tabagismo	29	41	36		29	33	40		11		24	12			29
Frutta & verdura < 600 gr/di		7	17	3			36								3
Sovrapeso				37				20		12					3
Attività fisica < 2.5 h/settimana				36				15							2
Iniezioni sanitarie contaminate					3										3
Fumo dal focolaio							0								0
Inquinamento aria urbana							12								1
Sesso non sicuro									17						1
Cause & fattori rischio ignoti	57	28	47	24	35	67	12	51	72	88	76	88	95	100	54

© Cc by P. Forster nc-2.5-it secondo: Goodarz, Dameiet et al.: Causes of Cancer ... ; Lancet 2005; 366: 1784-93

Fig. 1.1 Tumori e fattori di rischio nei paesi sviluppati.

La mortalità per cancro può essere ridotta se i casi sono rilevati e trattati precocemente, ad esempio tramite la diagnosi precoce o lo screening. Lo screening mira ad identificare gli individui che presentano anomalie di un cancro specifico o pre-cancro e di sottoporre loro prontamente al trattamento. La diagnosi precoce, cioè la consapevolezza dei primi segni e sintomi al fine di ottenere una loro diagnosi e quindi un eventuale trattamento, è particolarmente importante quando non ci sono i metodi di screening efficaci.¹

1.2 Patogenesi della malattia

Una **neoplasia** (dal greco *neos*, «nuovo», e *plásis*, «formazione») o un **tumore** (dal latino *tumor*, «rigonfiamento»), indica, in patologia, “una massa anormale di tessuto che cresce in eccesso ed in modo scoordinato rispetto ai tessuti normali,”³ che può invadere qualsiasi parte del corpo e diffondere quindi ai tessuti, in un processo noto come metastasi. Le metastasi rappresentano la principale causa di morte per cancro.¹

Le cellule proliferanti sono elementi anomali, che per cause ancora poco note si sono resi più o meno indipendenti dai meccanismi che regolano i processi di proliferazione e di differenziazione cellulare, e di accrescimento dei tessuti. Come conseguenza tali cellule creano una massa anormale di tessuto, che di solito deforma e distrugge le normali strutture anatomiche entro le quali si sviluppa, provocando spesso la perdita progressiva della funzione del tessuto o dell'organo coinvolti. Un processo neoplastico può svilupparsi da qualunque tipo di cellula e di tessuto dell'organismo, molti tumori hanno un'origine monoclonale, derivano cioè dalla trasformazione e proliferazione di una singola cellula altri invece originano dalla trasformazione di un'area più o meno estesa di tessuto, nella quale prima che il tumore si sviluppi si possono osservare alterazioni citologiche e strutturali di vario tipo, che preludono alla trasformazione neoplastica. Il tumore si comporta come qualcosa di autonomo e di estraneo all'organismo e le sue cellule, non più subordinate al piano di regolazione generale, utilizzano l'organismo solo come supporto nutritivo.

In rapporto al loro comportamento biologico si distinguono tumori benigni e maligni. Neoplasie benigne sono caratterizzate da un accrescimento lento ed a carattere espansivo: la lesione cioè si accresce spostando e comprimendo i tessuti vicini, ma senza infiltrarli e senza diffondere nell'organismo. La struttura di un tumore benigno e i caratteri delle sue cellule sono molto simili a quelli del tessuto di origine inoltre i tumori benigni non hanno tendenza a recidivare una volta asportati, e in generale non costituiscono una minaccia per l'organismo. Neoplasie maligne hanno un accrescimento più rapido ed a carattere invasivo: le cellule neoplastiche infiltrano le strutture vicine distruggendole, e possono anche penetrare entro il lume di vasi sanguigni o linfatici: esse vengono allora trasportate a distanza dalla sede del tumore e possono arrestarsi in vari tessuti, ove proliferano e formano focolai tumorali secondari, indipendenti dalla lesione primitiva, che vengono definiti appunto metastasi. Per questo loro carattere aggressivo nei confronti dell'organismo i tumori maligni possono condurre a morte il paziente.

I tumori maligni sono in genere formati da cellule atipiche, meno differenziate rispetto a quelle del tessuto di origine, con notevoli variazioni di forma e di dimensioni. I nuclei sono voluminosi e ipercromatici, a struttura irregolare. Spesso nel tessuto tumorale si osservano numerose mitosi, segno di attività proliferativa intensa.⁴

All'origine di tutti questi fenomeni ci sono alterazioni geniche, dette mutazioni, che, sommandosi l'una all'altra, fanno saltare i meccanismi di controllo. Non basta, infatti, che sia difettoso un solo meccanismo, ma occorre che gli errori si accumulino su diversi fronti perché il tumore possa cominciare a svilupparsi. Alcuni di queste mutazioni sono ereditarie, mentre altre sono provocate da fattori esterni, come abbiamo già visto.

La cancerogenesi coinvolge molteplici errori e il malfunzionamento di vari meccanismi di riparo, ad esempio:

1. **Il fallimento della riparazione del DNA.** Se avvengono mutazioni sui geni proto-oncogeni, geni codificanti per proteine che stimolano il ciclo cellulare, si favorisce la trasformazione neoplastica, oppure possono avvenire mutazioni sui geni soppressori di tumori, come il gene *tumor suppressor p53* (Fig. 1.2), che previene nei normali processi cellulari, mediante l'apoptosi, la cancerogenesi.⁵ Si potrebbe, inoltre, stabilire un'associazione mutazionale di geni proto-oncogeni e soppressori di tumori, venendo a mancare l'equilibrio tra processo mitotico e apoptotico.

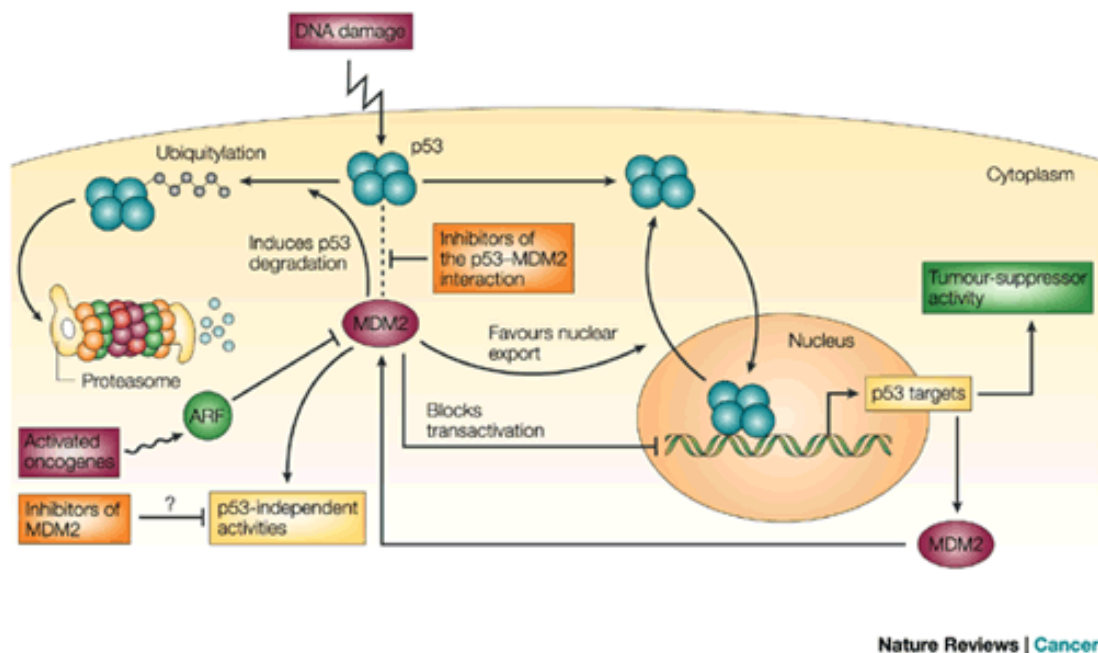


Fig. 1.2 : Il soppressore tumorale p53 e la proteina MDM2 (E3 ubiquitin-protein ligase MDM2) costituiscono un raffinato sistema di regolazione reciproca. Infatti l'antigene antitumorale cellulare p53 stimola l'espressione genica di MDM2, quest'ultimo, invece, è in grado di inibire l'attività trascrizionale favorire la traslocazione nucleare e stimolare la degradazione dell'oncosoppressore p53. L'attivazione di oncogeni o eventuali danni al DNA inducono l'attivazione, tramite meccanismi di fosforilazione, del p53, impedendo, di conseguenza, la sua associazione con la proteina MDM2. Inoltre gli oncogeni attivati promuovono l'attività della proteina ARF (Alternate Reading Frame), che è in grado di prevenire la degradazione di p53 MDM2-mediata. Allo stesso tempo gli inibitori dell'interazione p53-MDM2 dovrebbero promuovere l'attività oncosoppressore del p53 nelle cellule tumore che esprimono p53 *wild-type*.⁶

2. **Il fallimento del processo apoptodico.** L'apoptosi (morte cellulare programmata) è molto importante, in quanto contrasta l'espansione clonale di cellule iniziate e tumorali. Si possono avere delle mutazioni su geni codificanti per proteine antiapoptotiche (bcl-2) con espressione aberrante, e inibizione delle proteine apoptotiche (bax) e quindi la formazione di cellule preneoplastiche. Un esempio è l'inibizione dell'apoptosi nella patogenesi del linfoma umano a carico delle cellule B.

3. **Il fallimento nella terminazione della proliferazione.** In questo caso un' aumentata attività mitotica, se indotta da oncogeni all'interno della cellula o da fattori esterni come xenobiotici o da mitogeni endogeni, promuove la cancerogenesi per un certo numero di ragioni: si favoriscono le mutazioni, in quanto si ha un accorciamento della fase G₁, quindi si ha meno tempo disponibile per la riparazione del DNA danneggiato. Si ha un'elevata soppressione dei proto-oncogeni, che possono cooperare con le proteine oncogeniche, affinché si faciliti la trasformazione neoplastica delle cellule. Inoltre, l'aumento dell'attività mitotica porta, indirettamente, ad un'intensa attività trascrizionale di geni proto-oncogeni ed oncogeni, riducendo il tempo della metilazione del DNA. L' ipometilazione del genoma è una concausa della sovraespressione di proto-oncogeni ed oncogeni. Un altro meccanismo mediante il quale la proliferazione promuove il processo della cancerogenesi è l'espansione clonale delle cellule iniziate a formare noduli e tumori. Infine, durante la proliferazione, la comunicazione e l'adesione intracellulare attraverso la *gap-junction* e le caderine sono temporaneamente distrutte.⁷ La mancanza di queste giunzioni contribuisce all'invasività delle cellule tumorali. Non è tuttavia chiaro se l'interruzione della comunicazione svolga un ruolo significativo nella cancerogenesi, o piuttosto sia semplicemente un sinonimo della proliferazione cellulare.

Possiamo considerare quindi due categorie di fattori importanti che conducono alla cancerogenesi: i fattori genotossici ed i fattori epigenetici; i primi causano la formazione di cellule tumorali, in quanto provocano un'alterazione diretta sul DNA, mentre i secondi non agiscono direttamente sul DNA, ma hanno un'azione sinergica nell'iniziato processo tumorale.

Tra i cancerogeni non genotossici o epigenetici ad esempio abbiamo:

- gli xenobiotici mitogeni, come il fenobarbital, esteri del forbolo, DDT, proliferatori dei perossisomi;
- i mitogeni endogeni, come i fattori di crescita, (TGF- α), e gli ormoni con azione mitogena su

cellule specifiche, estrogeni sulla ghiandola mammari, TSH sulle cellule follicolari della tiroide, ormone luteinizzante (LH) sulle cellule di Leydig nei testicoli;

- agenti esterni, che somministrati cronicamente, causano danno cellulare come il d-limonene o il cloroformio.

I cancerogeni non genotossici favoriscono la cancerogenesi iniziata dai cancerogeni genotossici, e partecipano all'inibizione dell'apoptosi e all'espansione clonale delle cellule trasformate.⁵

1.3 TERAPIA ANTITUMORALE

“Coloro i quali non hanno studiato chimica o medicina, che dopotutto è solo chimica applicata, possono non realizzare come sia realmente difficile il problema del trattamento del cancro. È difficile quasi, non come, ma quasi come trovare un agente che possa distruggere l’orecchio sinistro e lasciare l’orecchio destro illeso: così piccola è la differenza tra la cellula cancerosa e la sua progenitrice normale.”

Dr. William H. Woglom “American Association for the Advancement of Science” 1947.

Tradizionalmente, i farmaci antitumorali sono stati scoperti grazie a molteplici e accurate analisi su vasta scala di sostanze chimiche di sintesi e di composti naturali in modelli animali di tumori a rapida crescita, in particolare di leucemia murina (Chabner e Roberts, 2005). I primi chemioterapici antitumorali erano in grado di interagire con il DNA o con i suoi precursori, inibendo la sintesi di nuovo materiale genetico o causando un danno irreparabile al DNA stesso. Recentemente, la ricerca di nuovi farmaci si è estesa dai convenzionali prodotti naturali come il *Paclitaxel* e farmaci semisintetici quali l’*Etoposide* a campi di ricerca completamente innovativi e pionieristici. Quest’ultimi rappresentano il traguardo conquistato grazie alle nuove conoscenze sulla biologia delle cellule tumorali e hanno portato all’ottenimento di farmaci che inibiscono nuovi bersagli molecolari. Uno di questi farmaci è l’*acido retinoico all-trans*, esso stimola la differenziazione e può essere utilizzato per promuovere la remissione nella leucemia promielocitica acuta (*acute promyelocytic leukemia*, APL) grazie alla sua interazione con le proteine di fusione, prodotte dalla traduzione RAR-PML, anche dopo che la terapia standard ha fallito.⁸

Allo stesso modo, approcci immunologici mirati utilizzano gli anticorpi monoclonali contro antigeni associati al recettore her-2/neu nel cancro al seno, spesso in associazione con farmaci citotossici.⁹ Gli esempi appena riportati sottolineano sia che le strategie per la valutazione dei farmaci sia le normali cure dei pazienti affetti da tumore subiranno, molto probabilmente, cambiamenti radicali dal momento che nuovi approcci terapeutici derivano dalle nuove conoscenze sulla biologia dei tumori. **(Fig 1.3)**. Nuovi studi clinici sono stati orientati verso la determinazione degli effetti dei nuovi farmaci a livello molecolare, sfruttando sempre più marker urinari ed ematici di proliferazione del tumore, di angiogenesi ed altri *end point* biologici. L’*imaging* di effetti molecolari, metabolici o fisiologici dei farmaci diventerà sempre più importante nello stabilire che i farmaci si legano efficacemente ai loro bersagli (Fox et al., 2002). Mentre farmaci con bersagli molecolari hanno uno straordinario successo nella CML (*chronic myelocytic leukemia*) e nell’APL, è poco probabile che le nuove terapie riescano a rimpiazzare i farmaci citotossici nel prossimo futuro. Quando utilizzati in

combinazione e nelle prime fasi della patologia tumorale, gli agenti citotossici si sono rivelati sempre più efficaci. Allo stesso tempo la loro tossicità è divenuta sempre più controllabile con lo sviluppo di farmaci anti-nausea più efficaci e con il fattore che stimola le colonie di granulociti (G-CSF) e l'eritropoietina a ristabilire la funzionalità del midollo.⁸

Nel programmare chemioterapie oncologiche mirate per l'uso clinico, una serie di fattori deve essere tenuta in considerazione. I farmaci sono più efficaci in combinazione e possono essere sinergici in seguito a interazioni biochimiche. È più efficace associare farmaci che non hanno lo stesso meccanismo di resistenza e non hanno tossicità sovrapponibili. I farmaci citotossici dovrebbero essere utilizzati il più vicino possibile ai loro dosaggi massimi individuali e somministrati il più frequentemente possibile per contrastare la ricrescita tumorale, massimizzando l'intensità del dosaggio, cioè la dose somministrata per unità di tempo, che rappresenta un parametro chiave per il successo della chemioterapia.¹⁰

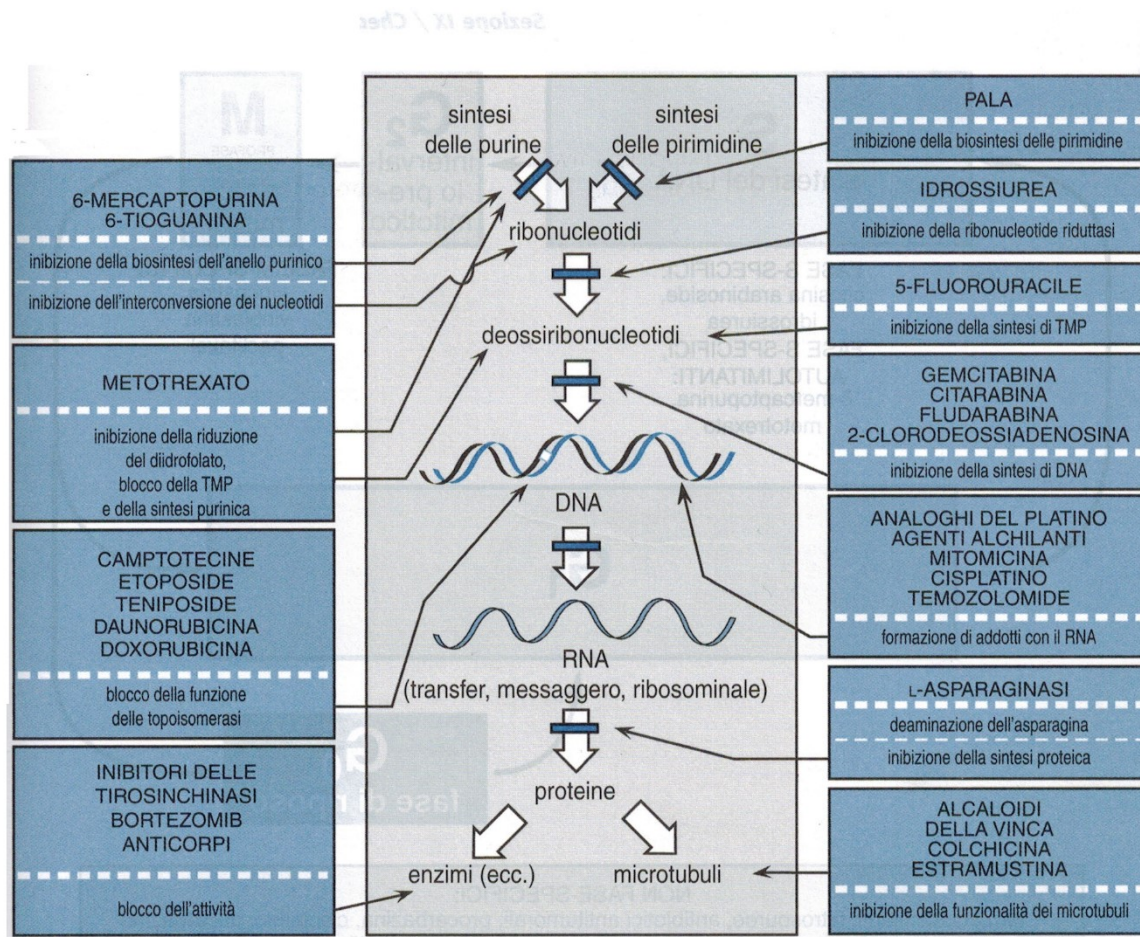


Fig. 1.3: Schema dei meccanismi e dei siti d'azione di alcuni agenti chemioterapici utilizzati nelle patologie neoplastiche. (PALA= *N*-fosfonacetil-L-aspartato; TMP= timidina monofosfato).⁸

Dal momento che una popolazione di cellule tumorali, nel caso di una patologia clinicamente rilevabile, supera il peso di 1g (10^9 cellule) e che ogni ciclo di terapia uccide meno del 99% delle cellule, è necessario ripetere i trattamenti in cicli multipli per eliminare le cellule cancerose.⁸

Il trattamento di pazienti affetti da patologie tumorali richiede un'abile commistione di molteplici modalità di trattamento unitamente a farmaci, tra cui chirurgia e irradiazione. Ognuna di queste strategie di trattamento ha i suoi rischi e benefici. È ovvio che non tutti i regimi terapeutici sono appropriati per tutti i pazienti, infatti devono essere considerati molteplici fattori, quali le funzionalità epatica e renale, lo stato generale del paziente e problemi medici concomitanti.

Vi sono, inoltre, fattori meno quantificabili quali la probabile storia naturale del tumore che deve essere trattato, la volontà del paziente di sottoporsi a trattamenti potenzialmente pericolosi, la capacità emozionale e fisica del paziente nel gestire gli effetti collaterali e la probabilità di rischi e benefici a lungo termine.⁸

Una delle più grandi sfide della terapia antineoplastica è aggiustare il dosaggio in modo da raggiungere un risultato terapeutico senza tossicità. Sebbene sia consuetudine basare il dosaggio sulla superficie corporea di un singolo paziente, questa pratica non ha dati inequivocabili.¹¹

L'aggiustamento del dosaggio in base alla funzione renale o su controlli farmacocinetici aiuta a raggiungere obiettivi specifici come la concentrazione ematica desiderata o l'AUC (*area under the concentration-time curve*) ottimale e una misura dell'esposizione dei tessuti al farmaco in questione.¹¹

Malgrado i costanti studi condotti per prevedere lo sviluppo degli effetti indesiderati, gli agenti anticancro continuano ad avere una farmacocinetica e una tossicità variabili nei singoli pazienti. Le cause di questa variabilità non sono sempre chiare e spesso possono essere dovute a differenze interindividuali nel metabolismo dei farmaci o nell'interazione tra diversi farmaci. Le tossicità ritardate possono colpire cuore, polmoni o reni sono irreversibili, causando un danno permanente, che potrebbe sfociare nella morte del paziente. Fortunatamente, queste tossicità possono essere minimizzate aderendo a protocolli standard e alle linee guida per l'uso dei farmaci.⁸

Attualmente i chemioterapici antitumorali vengono classificati in base al loro meccanismo d'azione:

- **Farmaci Alchilanti:** i chemioterapici alchilanti hanno in comune la proprietà di divenire potenti elettrofilici in seguito alla formazione di intermedi carbocationici o di complessi di transizione correlati. Questi intermedi, particolarmente reattivi, portano alla formazione di legami covalenti attraverso l'alchilazione di gruppi nucleofili come gruppi fosfato, amminici, sulfidrici, ossidrilici, carbossilici e imidazolici. I loro effetti chemioterapici e citotossici sono direttamente correlati all'alchilazione del DNA. L'atomo di azoto in posizione 7 della guanina è particolarmente sensibile alla formazione di un legame covalente con farmaci alchilanti

bifunzionali e può essere considerato un bersaglio chiave che determina i relativi effetti biologici. Analogamente l’N1 e N3 dell’adenina, l’N3 della citosina e l’O6 della guanina sono coinvolti nella formazione di legami con gli agenti alchilanti⁸ (Fig.1.4).

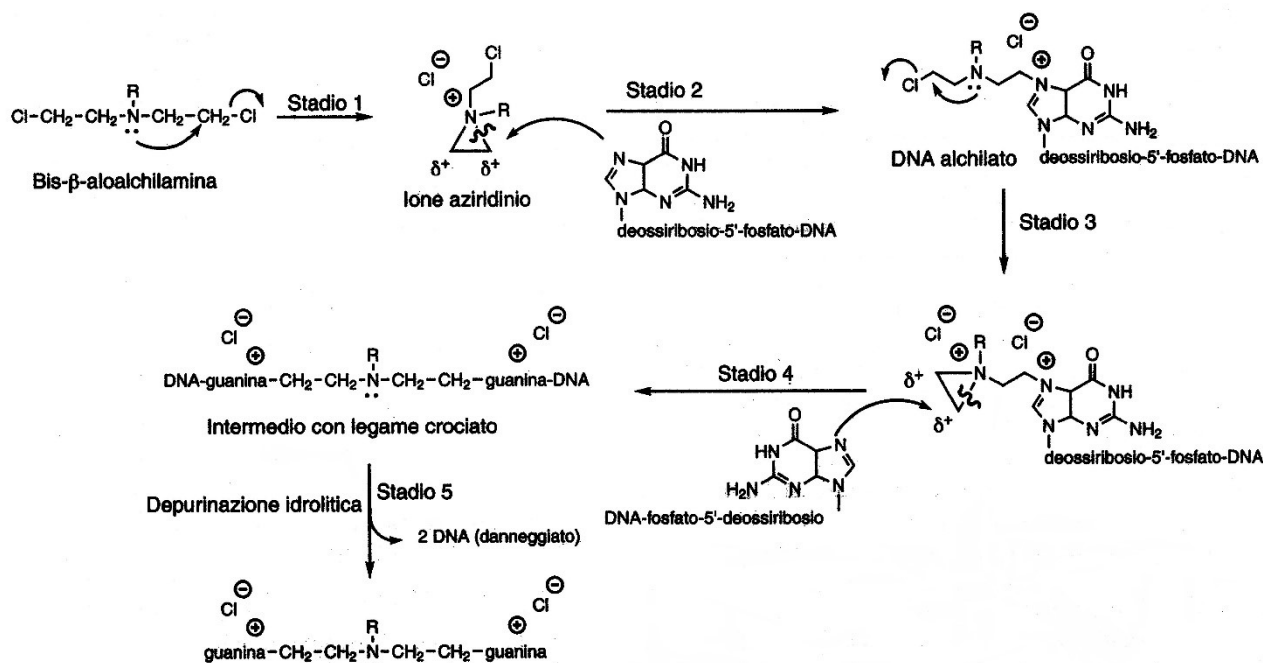


Fig.1.4: nel primo stadio, il lone pair del gruppo amminico non ionizzato attacca nucleofilicamente il carbonio in β della mostarda azotata sostituendo l’atomo di cloro, formando l’intermedio altamente reattivo, lo ione aziridinico. Gli atomi di carbonio di questa struttura ciclopropanica sono altamente elettrofili a causa del forte effetto induttivo negativo dell’azoto caricato positivamente. Nel secondo stadio, un gruppo nucleofilo del DNA conduce un attacco nucleofilo intermolecolare che rompe l’anello aziridinico e alchila il DNA. È di cruciale importanza che la coppia solitaria di elettroni della mostarda azotata venga rigenerata quando viene rotto il nucleo aziridinico. Gli stadi 3 e 4 sono semplicemente delle ripetizioni rispettivamente degli stadi 1 e 2 che coinvolgono la seconda catena alchilica della mostarda azotata e una seconda molecola di DNA. In ultima analisi, 2 molecole di DNA saranno unite con un legame crociato. La depurinazione idrolitica nello stadio 5 allontana i residui guaninici legati al filamento di DNA, rilasciando il DNA ormai danneggiato e quindi incapace di replicarsi¹².

- **Antimetaboliti:** questa classe di farmaci comprende i derivati dell’acido folico (Metotrexato), analoghi purinici (Fludarabina) e gli analoghi pirimidinici (Citarabina). Generalmente essi inibiscono la sintesi *de novo* del DNA, inibendo la formazione dei nucleotidi che compongono questi polimeri essenziali per la vita. Gli antimetaboliti si comportano da falsi substrati per gli enzimi coinvolti nella biosintesi di nucleotidi essenziali. Essi sono stati progettati per esercitare un’attrazione maggiore rispetto al substrato endogeno, attraverso un meccanismo di intrappolamento chimico, che spinge gli enzimi a legare il farmaco in maniera irreversibile. Se gli intermedi nucleotidici non possono essere sintetizzati, la biosintesi del DNA risulta compromessa di conseguenza la patologia tumorale rallenta, dando al paziente la possibilità

di remissione o di guarigione.¹² Gli antagonisti purinici inibiscono la sintesi dei nucleotidi AMP (adenilato monofosfato) e GMP (guanilato monofosfato), gli antagonisti pirimidinici inibiscono la produzione di dTMP (deossitimidina monofosfato). Infine, gli antagonisti dell'acido folico, come il Metotrexato strutturalmente progettato per competere con successo con il 7,8-DHF (7,8-Diidrofolato) per il sito attivo dell'enzima DHFR (Diidrofolato Reduttasi). L'inibizione diretta della DHFR causa aumenti dei livelli cellulari di 7,8-DHF, che a sua volta si traduce in un'inibizione indiretta della timidilato sintetasi. Inoltre la catena monoglutamato del Metotrexato permette il trasporto attivo all'interno delle cellule. Una volta all'interno della cellula, esso subisce una reazione di poligluttamazione che aggiunge diversi gruppi carbossilato per bloccare il farmaco al sito d'azione. La poligluttamazione è più efficiente nelle cellule tumorali piuttosto che nelle cellule sane, quindi potrebbe promuovere la tossicità selettiva di questo farmaco. Le cellule cancerose, nel tempo, potrebbero diventare resistenti al Metotrexato, ciò potrebbe essere dovuto ad un maggiore efflusso dalle cellule tumorali e una velocità di poligluttamazione inferiore. Infine, il Metotrexato è anche capace di inibire la GAR (glicina amide ribonucleotide) un enzima chiave per la sintesi di nucleotidi purinici.¹² Fondamentale è la diversità strutturale tra il Metotrexato e il 7,8-DHF (**Fig.1.5**).

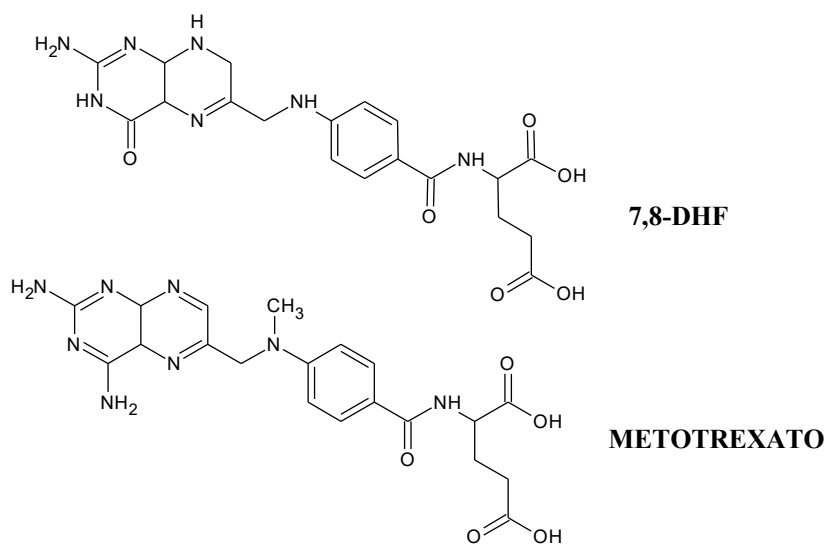


Fig.1.5: Diversità strutturale tra 7,8-DHF e Metotressato.

- **Antimitotici:** il processo mitotico dipende dalle caratteristiche strutturali e funzionali dei microtubuli (eterodimeri polimerici composti da isotipi di proteine α e β tubuliniche). Queste proteine del peso di 50kDa sono adiacenti l'una all'altra all'interno del tubulo e si arrotolano fino a formare un cilindro. Una proteina γ tubulinica si trova al centro organizzativo dei

microtubuli, la natura degli isotipi tubulinici che si trovano nei microtubuli viene conservata completamente in tessuti specifici all'interno di una determinata specie e influenza la sensibilità della cellula ad agenti antimitotici. Durante la divisione cellulare, la tubulina subisce periodi intensi, sporadici e alterni di crescita strutturale e di erosione, noti come "instabilità dinamica". Le proteine alternativamente riescono a polimerizzare e depolimerizzare attraverso processi dipendenti dalla guanosina trifosfato e dal Ca^{+2} . La polimerizzazione comporta l'aggiunta di dimeri tubulinici alle 2 estremità del tubulo, anche se risulta coinvolta più comunemente l'estremità positiva che cresce più velocemente. Producendo un allungamento tubulare, mentre la depolimerizzazione causa un accorciamento della struttura. La frenetica alterazione strutturale, agevolata dalle proteine associate ai microtubuli (MAPs) permette, in ultima analisi, la formazione del fuso mitotico e il binding con i cromosomi, presupposto essenziale per la divisione cellulare. L'inibizione dei cambiamenti iperdinamici essenziali nella microstruttura tubulare produce un arresto mitotico e l'apoptosi. Attualmente sono commercializzati, per il trattamento di patologie tumorali, due classi di farmaci antimitotici: i taxani e gli alcaloidi della vinca. Il binding taxano-tubulina rende i microtubuli resistenti alla depolimerizzazione, favorendo la fase di allungamento dell'instabilità dinamica dei microtubuli a scapito della fase di accorciamento. Viene, di conseguenza, inibito il disassemblaggio del tubulo nel fuso mitotico, portando così all'interruzione del normale processo di divisione cellulare.¹³ Al contrario dei taxani, gli alcaloidi della vinca fermano la divisione cellulare inibendo la polimerizzazione. Essi si legano all'interfaccia dei due etero dimeri nel lumen tubulare interno sull'estremità positiva dei tubuli, diminuendo l'assorbimento della guanosina trifosfato essenziale per il processo di allungamento tubulare.¹⁴

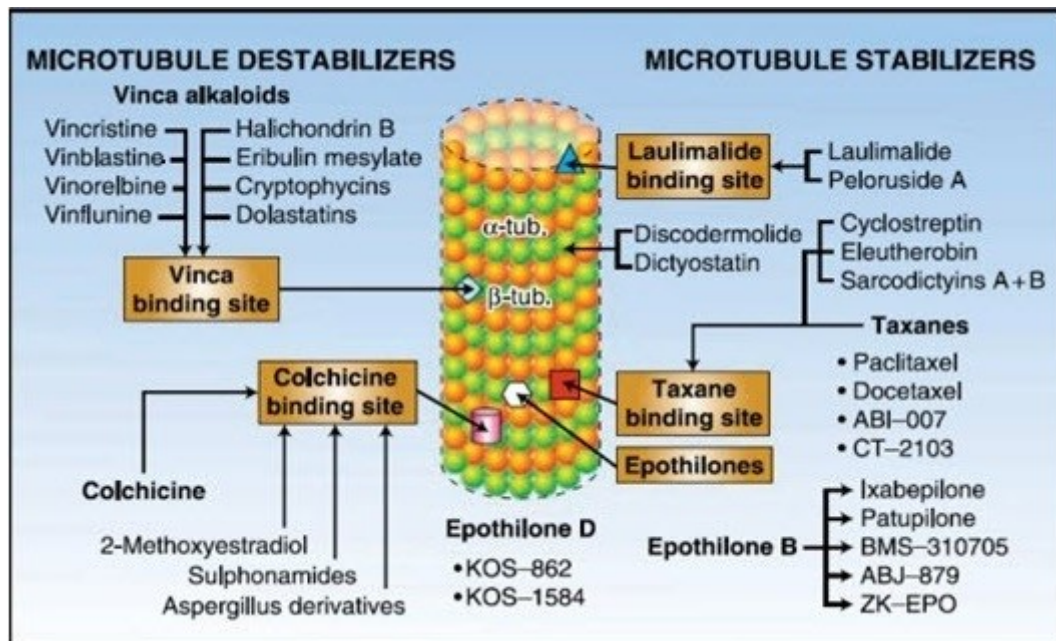


Fig.1.6: Siti di legame dei principali antitumorali antimetabolici.

- Antibiotici:** gli antibiotici antineoplastici sono una vasta categoria di composti naturali o semisintetici che bloccano la trascrizione del DNA tagliando e/o inducendo punti di mutazione sul filamento di DNA e/o inibendo enzimi critici per il processo di replicazione del DNA. Questa classe di farmaci interagisce direttamente con il DNA, in quanto sono in grado di intercalarsi, inizialmente, nella doppia elica, inserendosi tra le coppie di basi e formando forti interazioni non covalenti. I complessi altamente stabilizzati deformano e srotolano il DNA, impedendone la sua replicazione. Per trovare la sua allocazione tra i filamenti di DNA, una porzione dell'antibiotico deve avere una geometria trigonale piana garantita dall'aromaticità.¹² Molti degli antibiotici antineoplastici inibiscono l'enzima topoisomerasi II, responsabile del mantenimento della corretta struttura del DNA durante la replicazione e la trascrizione all'RNA. La topoisomerasi II normalmente scinde il DNA durante la fase di replicazione, ma ripara il suo danno a replicazione completa. Gli inibitori della topoisomerasi II agiscono stimolando la reazione di scissione, riuscendo ad inibire l'attività riparatrice dell'enzima, lasciando il DNA irrimediabilmente danneggiato e incapace di replicarsi. Infine, un altro meccanismo proposto per l'azione citotossica degli antibiotici antineoplastici è la generazione di radicali liberi, che causano la rottura dei filamenti di DNA.¹² Gli antibiotici antraciclinici e i loro derivati sono tra i più importanti farmaci antitumorali. Appartengono a questa famiglia di farmaci la Daunorubicina, l'Idarubicina, utilizzate soprattutto nel trattamento delle leucemie acute, la Doxorubicina e l'Epirubicina, invece, dimostrano un'attività più ampia verso i tumori solidi. Questi agenti condividono la capacità di generare

radicali liberi, causando un'inusuale e spesso irreversibile cardiomiopatia, la cui comparsa è correlata alla dose totale del farmaco.⁸ Il meccanismo è catalizzato dall'enzima NADPH/CYP450 riduttasi che è in grado di ridurre l'anello chinonico a idrochinone, formando radicali anionici superossido. Quest'ultimi reagiscono per dare perossido di idrogeno (H₂O₂), una reazione che richiede protoni e che è catalizzata dall'enzima superossido dismutasi in un processo mediato dal Cu⁺². Il destino del perossido di idrogeno determina il grado di citotossicità osservato nelle antracicline. In presenza dell'enzima catalasi, il perossido di idrogeno viene rapidamente convertito in acqua e ossigeno. Invece in presenza dello ione ferroso (Fe⁺²) l'H₂O₂ viene convertito nel radicale idrossilico altamente tossico, attraverso la reazione di Fenton in cui i radicali idrossilici provocano rotture di filamenti singoli del DNA, terapeuticamente auspicabile per trattare la crescita incontrollata delle cellule cancerose.¹² (Fig.1.7)

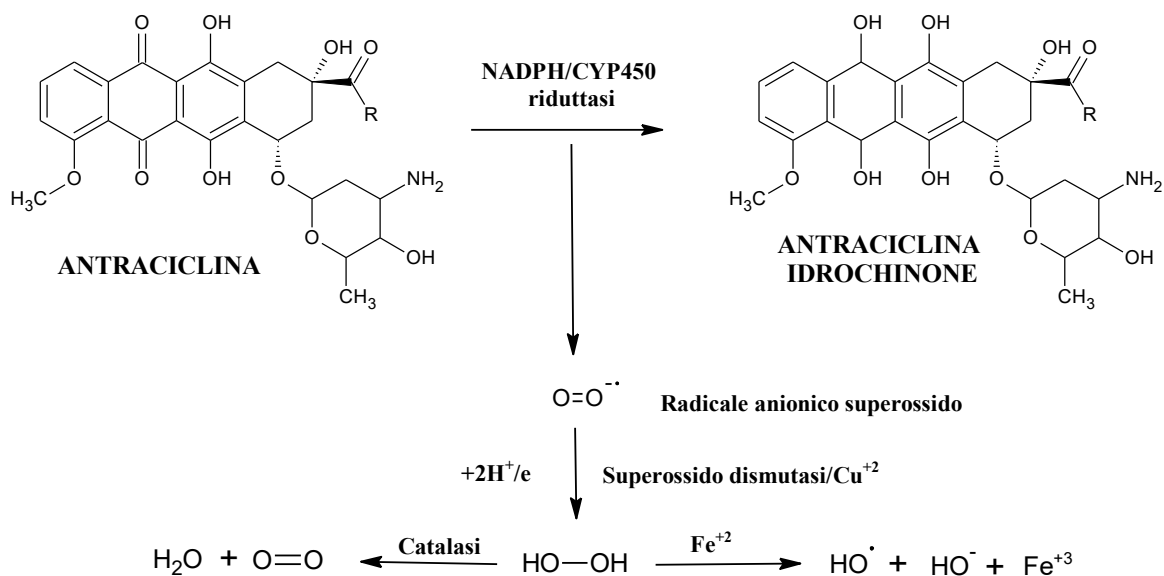


Fig.1.7: Formazione di radicali mediata dall'antraciclina.

- **Ormoni e composti correlati:** i glucocorticoidi, come prednisone e metilprednisone, sono comunemente somministrati come agenti antitumorali per sopprimere l'attività linfocitica e migliorare le possibilità di successo nel trattamento di leucemie e linfomi. Inoltre alcune patologie tumorali come il cancro al seno estrogeno-dipendente, il cancro endometriale e il cancro metastatico alla prostata, dipendono, per la loro crescita, dalla presenza di ormoni sessuali. In queste patologie l'uso di antagonisti del recettore steroideo, della sintesi di inibitori o di inibitori della secrezione della gonadotropina, da soli o in combinazione con altri farmaci antitumorali, è un comune approccio alla cura chemioterapica. Gli antiestrogeni come

il Tamoxifene, gli antiandrogeni come la Flutamide, i progestinici come il Megestrol acetato, gli inibitori dell'aromatasi come l'Exemestano e gli agonisti del fattore di rilascio dell'ormone luteinizzante come il Leuprolide acetato sono disponibili per il trattamento di tumori ormono-dipendente e spesso sono utilizzati dopo la chirurgia e/o la radioterapia.¹² Hugginns e collaboratori hanno ampiamente contribuito allo sviluppo della terapia antiandrogena per il carcinoma prostatico. Sebbene la terapia ormonale del carcinoma metastatico della prostata sia solo palliativa, tale trattamento ha aumentato l'aspettativa di vita dei pazienti. Gli approcci abituali per ottenere la riduzione delle concentrazioni degli androgeni endogeni o l'inibizione dei loro effetti comprendono l'orchietomia bilaterale, l'uso di antiandrogeni o, più comunemente, la somministrazione di agonisti dell'ormone di rilascio della gonadotropina (GnRH).⁸ In **Fig.1.8** viene mostrato la terapia ormonale con Tamoxifene e inibitori dell'aromatasi (AI) per il trattamento del cancro al seno. Il Tamoxifene è un inibitore competitivo del legame dell'estradiolo al recettore estrogenico (ER). Esistono due sottotipi recettoriali dell'ER: ER α e ER β , che hanno una diversa distribuzione tissutale e sono in grado di omodimerizzare ed eterodimerizzare. Il legame dell'estradiolo e dei SERM (*selective estrogen receptor modulator*) sul recettore causa un cambiamento conformazionale dell'ER, la dissociazione delle proteine *heat-shock* e la dimerizzazione di ER. La formazione del dimero facilita il legame con specifici elementi di risposta all'estrogeno (ERE *estrogen-response elements*) presenti sul DNA in prossimità dei geni regolati dall'estrogeno, attivando di conseguenza l'espressione di fattori genetici. Quando il Tamoxifene interagisce con ER α e ER β blocca in maniera competitivamente il legame dell'estradiolo, bloccando di conseguenza l'espressione genica e impedendo la proliferazione e sopravvivenza delle cellule tumorali. Spesso in terapia viene utilizzato l'associazione con gli inibitori delle aromatasi (Anastrozolo) nelle donne in postmenopausa con cancro al seno in stato precoce o avanzato positivo per il recettore ER. L'Anastrozolo è un potente e selettivo AI triazolico, esso si lega competitivamente e specificatamente al gruppo EME del CYP19 sopprimendo la maggior parte dell'attività periferica dell'aromatasi causando un marcato deficit di estrogeni.⁸

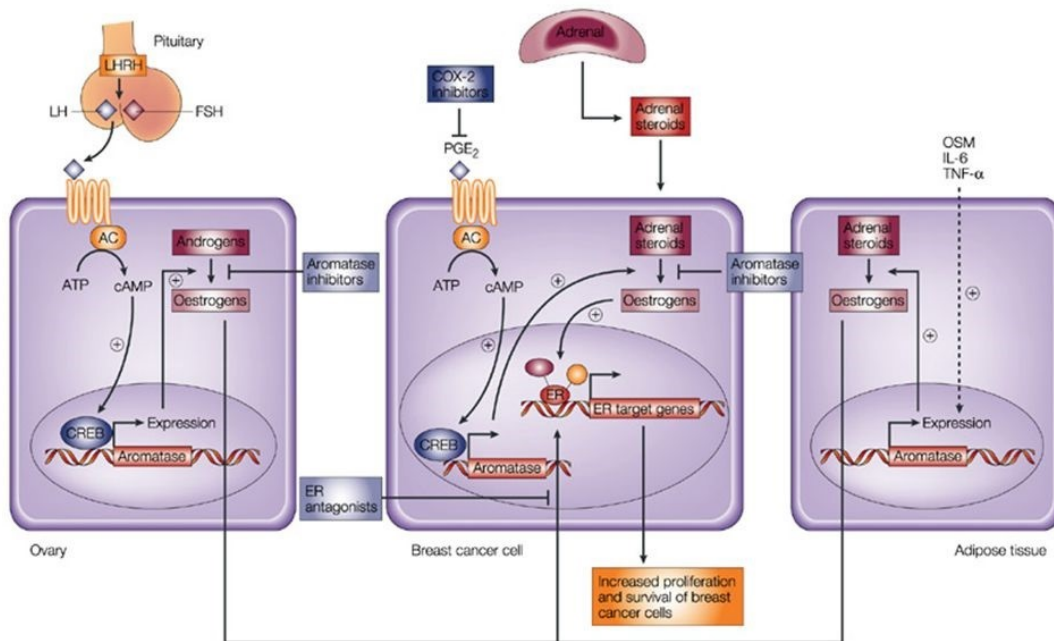


Fig.1.8: terapia ormonale con Tamoxifene e inibitori dell'aromatasi nel trattamento del cancro alla mammella.

1.4 MULTI-DRUG RESISTANCE (MDR)

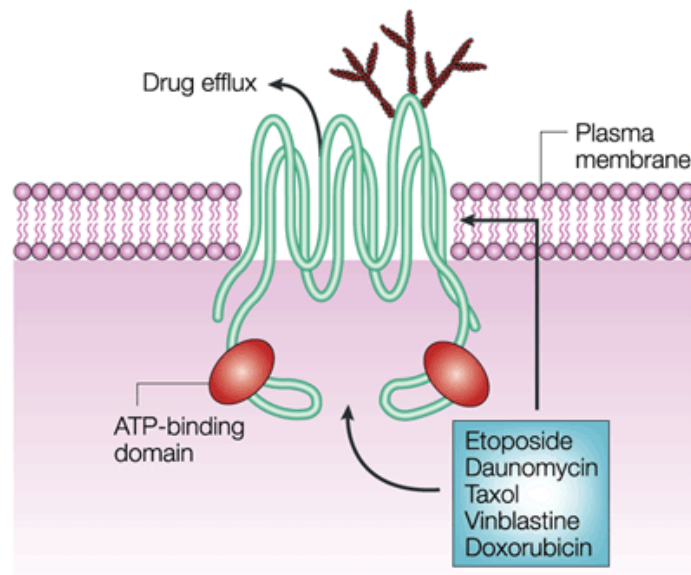
MDR è un fenomeno caratteristico di molte cellule tumorali che sono state esposte ad agenti citotossici, esse riescono a sviluppare resistenza crociata ad un variegato range di composti strutturalmente e funzionalmente non correlati.¹⁵ MDR è fra gli ostacoli più importanti da superare per una terapia antitumorale di successo.

In questi anni sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare lo sviluppo di farmaco resistenza nelle cellule tumorali, come: un possibile cambiamento nel target farmacologico, la riduzione dell'uptake o l'incremento di efflusso di un farmaco dalla cellula, la ridotta capacità di indurre apoptosi, un incremento delle capacità di riparazione del DNA, una differente compartimentalizzazione e un aumento degli stadi di detossificazione.

In modelli di cellule tumorali, uno fra i meccanismi più studiati è l'over-espressione di pompe d'efflusso ATP-dipendenti, come la glicoproteina P (P-gp) e le MDR-proteine associate (MRPs). L'over-espressione di queste proteine provoca nelle cellule tumorali resistenza ad un'ampia gamma di farmaci antitumorali (antracicline, alcaloidi della vinca e taxani) e sembra essere correlata a un'elevata attività proliferativa e a valori pro-diagnostici negativi.

Evidenze che le pompe d'efflusso, specialmente le P-gp, hanno un ruolo significativo nella resistenza ai farmaci usati in clinica hanno stimolato l'introduzione di inibitori delle P-gp in studi clinici. La Doxorubicina è comunemente usata nella terapia dei tumori solidi, ma la sua efficacia viene spesso ridotta perché è anche un substrato per P-gp e MRPs.¹⁵ Studi recenti su cellule tumorali umane del colon (HT29), suscettibili allo sviluppo di fenotipi MDR per diventare resistenti alla Doxorubicina, hanno dimostrato che la Doxorubicina stimola la produzione di ossido nitrico (NO) ed esercita la sua azione terapeutica attraverso meccanismi NO-dipendenti.¹⁵ Inoltre sono stati evidenziati i differenti gradi di produzione di NO in cellule sensibili e resistenti e le conseguenti risposte cellulari, infatti un decremento della sintesi di NO potrebbe essere coinvolto nell'inizio del processo di MDR. Il ripristino della sintesi e concentrazione di NO intracellulare, invece, potrebbe invertire lo sviluppo di MDR.¹⁵

(Fig.1.9)



Nature Reviews | Cancer

Fig.1.9: il gene multi-drug resistance MDR1, che codifica per la glicoproteina P-gp, è in grado di conferire resistenza ad un'ampia varietà di farmaci. Le glicoproteine P-gp sono capaci di trasportare gli agenti citotossici al di fuori della cellula, questo processo richiede dispendio di ATP. L'ATP si lega a specifici domini intracellulari (NBF, Nucleotide Binding Fold), essi appartengono alla famiglia dei trasportatori ABC (ATP-binding cassette). L'esatto meccanismo dell'efflusso di farmaci dalla cellula non è stato del tutto chiarito, ma potrebbe comportare un trasporto diretto dal citoplasma oppure la redistribuzione del farmaco, dato che è in grado di diffondere attraverso la membrana plasmatica. Alcuni agenti citotossici sono stati identificati come substrati per le P-gp, come: Etoposide, Daunomicina, Tassani, Vinblastina e Doxorubicina.¹⁶

1.5 CARATTERISTICHE GENERALI E RUOLO FISILOGICO DELL'OSSIDO NITRICO (NO)

L'ossido nitrico (NO) è un radicale biatomico endogeno a breve emivita, prodotto dall'enzima NO-sintetasi (NOS) a livello cellulare. Svolge il suo ruolo di mediatore biologico in svariati processi fisiologici, come la neurotrasmissione, la regolazione della pressione sanguigna, la funzione cardiaca, l'aggregazione piastrinica, il mantenimento dell'equilibrio redox cellulare. E' stato inoltre riconosciuto un importante ruolo di difesa, esercitando effetti citotossici contro i microrganismi infettivi e nel controllo della crescita dei tumori.¹⁷⁻²¹

In condizioni fisiologiche le cellule sintetizzano piccole, ma significative, quantità di NO in grado di contribuire alla regolazione di processi antiinfiammatori e antiossidanti.²² Invece, in presenza di

alterazioni fisiologiche la sintesi incontrollata di NO può contribuire allo sviluppo di numerose patologie, come il cancro.²² L'over-espressione dell'enzima NOS è stata rivelata in diversi tipi di cancro come: il cancro alla cervice, alla mammella, al SNC e alla laringe.²³⁻²⁵

La sintesi endogena dell'NO consiste nell'ossidazione del gruppo amminico dell'amminoacido (-)l-Arginina ad opera dell'enzima NOS, questa reazione di ossidazione richiede la presenza di cofattori come NADPH e O₂, portando all'N-idrossi L-arginina come intermedio di reazione, ligando dell'NOS e alla sintesi NO, dell'l-citrullina e NADP⁺ come prodotti finali. (Fig.1.10)

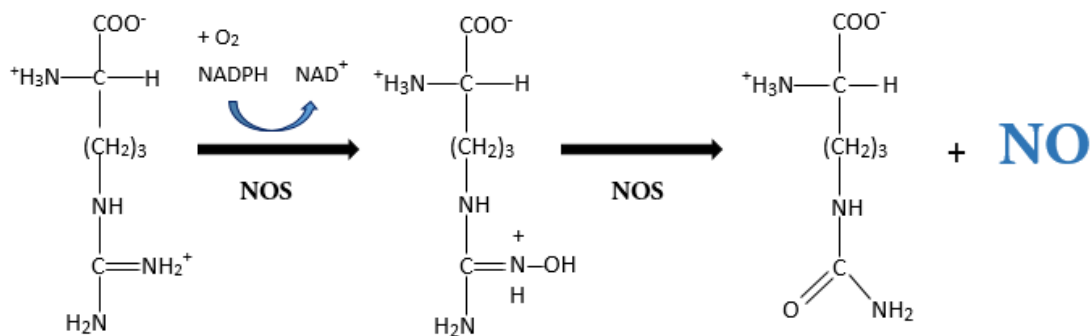


Fig.1.10: Schema di sintesi dell'NO a partire da l-Arginina.

Le cellule dei mammiferi producono tre isoforme di NOS con il 51%-57% di omologia, differente localizzazione, differente regolazione delle proprietà catalitiche e sensibilità ad eventuali inibitori, per esempio: le isoforme *n*NOS ed *e*NOS vengono espresse rispettivamente dalle cellule neurali ed endoteliali. Esse sono denominate come forme costitutive e vengono continuamente espresse, invece l'*i*NOS è un'isoforma inducibile.²⁶ Poiché l'NO è un radicale libero e altamente reattivo, manifesta la sua attività biologica prendendo parte ad una vasta gamma di reazioni chimiche. Esse dipendono strettamente dalla concentrazione di NO e dalle eventuali variazioni nella composizione dell'ambiente intra- ed extracellulare.

In generale gli effetti biologici dell'NO consistono in due principali meccanismi d'azione:

- **cGMP-dipendente:**²⁷ la molecola di NO si lega al gruppo eme dell'enzima guanilato ciclasi solubile (sGC) catalizzando la formazione del secondo messaggero cGMP dal GTP. Il secondo messaggero cGMP attiva, di conseguenza, le proteine chinasi cGMP-dipendenti, regola le fosfodiesterasi e i canali ionici cGMP-dipendenti,²⁸ che culminano nelle principali funzioni biologiche dell'NO, come: vasodilatazione, neurotrasmissione, inibizione dell'aggregazione piastrinica, rilassamento della muscolatura liscia²⁷ e angiogenesi.²⁹ Inoltre, quando l'NO attiva sGC può indurre processi apoptotici attraverso la fosforilazione delle proteine chinasi cGMP-dipendenti, l'attivazione della via di trasduzione P13K/Akt, fosforilazione delle

proteine pro-apoptotiche Bad e conseguente soppressione del citocromo-c e attivazione della caspasi-3.²⁷

- **cGMP-indipendente:** comprende tutte le reazioni dell'NO che non sono mediate da sGC, ma che avvengono tra NO e l'O₂ molecolare, radicali dell'anione superossido O^{•-}, tioli e metalli di transizione come lo zinco.²⁷ Questo meccanismo cGMP-indipendente comprende la reazione di S-nitrosilazione dei residui cisteinici ad opera dell'NO. L'S-nitrosilazione è un'importante forma di modificazione post-trasduzionale dei canali ionici. Inoltre l'NO è in grado di provocare modificazioni covalenti ai residui tirosinici mediante una reazione di nitratazione sull'anello aromatico.²⁷

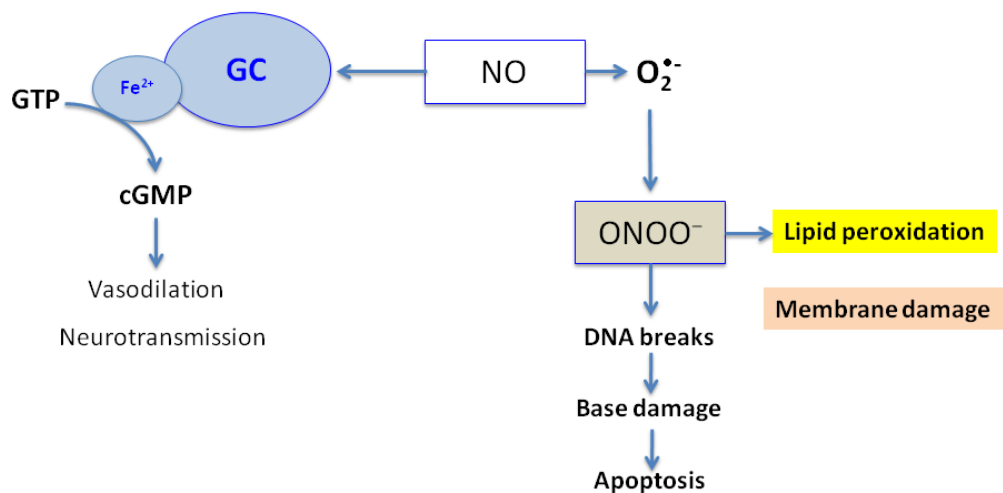
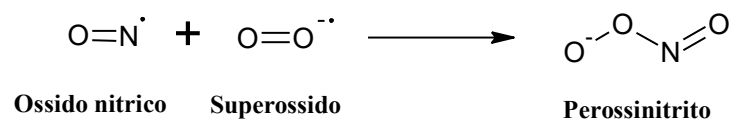
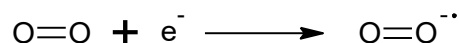


Fig.1.11: meccanismi cGMP-dipendente e cGMP-indipendente dell'NO.

Quando le concentrazioni di NO sono rilevanti, esso è in grado di reagire con il radicale dell'anione superossido O^{•-} producendo un intermedio instabile il perossinitrito (ONOO⁻), che è un potente agente ossidante citotossico che causa danni al DNA e perossidazione lipidica. Per questa reazione non è richiesta la presenza di alcun enzima, in quanto nessun enzima sarebbe in grado di catalizzare ancora più velocemente la reazione.³⁰



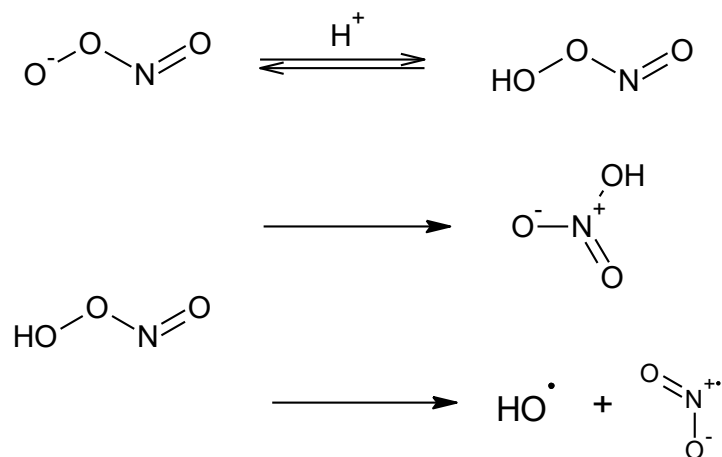
L'anione superossido O₂^{•-} è sia una specie altamente reattiva che un potente agente ossidante in grado di generare danni cellulari. Esso viene prodotto dalla reazione di riduzione di O₂:



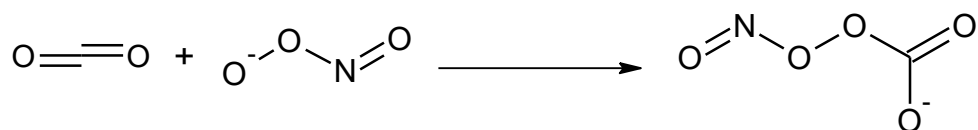
Il radicale superossido è generato dal metabolismo cellulare come la fagocitosi, dalla respirazione

mitocondriale, dalla detossificazione di xenobiotici o da altri fattori endogeni come le radiazioni ionizzanti.³¹ Esso viene rapidamente rimosso dall'enzima superossido dismutasi (SOD), appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, che viene distinto in diverse isoforme, come SOD1 presente a livello citoplasmatico, SOD2 presente nei mitocondri e la SOD3 localizzata nei compartimenti extracellulari. SOD trasforma i radicali superossidi in perossido di idrogeno (H₂O₂), che a loro volta vengono metabolizzati dai perossisomi o da varie perossidasi. Quando l'ossido nitrico viene prodotto in quantità abbastanza elevate riesce a competere con la SOD e a reagire con i radicali superossido, portando alla formazione di perossinitrito (ONOO⁻).³⁰

Inoltre in assenza di scavengers, il ONOO⁻ viene protonato ad acido perossinitroso (HONOO) che successivamente decompone in nitrato (NO₃⁻) e radicali liberi intermedi, come il radicale idrossilico (OH[•]) e in biossido di azoto radicalico (NO₂[•]):



Nella maggior parte dei sistemi biologici, l'anidride carbonica (CO₂) è considerata uno scavenger di ONOO⁻, in grado di reagire con il perossinitrito e formare l'anione nitrosoperossicarbonato:



Quest'ultimo ha una brevissima emivita e decompone spontaneamente in nitrato, anidride carbonica e causando la formazione di radicali come CO₃^{•-} e [•]NO₂.

Di conseguenza, quando NO è presente in elevate concentrazioni gli effetti citotossici del suo metabolismo sono considerevoli, infatti metaboliti come ONOO⁻ provocano la nitratura dei residui tirosinici e l'ossidazione della guanosina, la degradazione dei carboidrati, la perossidazione lipidica e danni al DNA, con importanti coinvolgimenti nella patogenesi tumorale. Inoltre l'interazione di NO con O₂ causa stress nitrosidativo perché viene prodotto triossido di diazoto (N₂O₃), un potente agente nitrosante, in grado di formare derivati nitro-amminici e nitroso-tiolicci. Questo processo di N-

nitrosazione è fortemente implicato nei processi di infiammazione cronica e nello sviluppo di tumori. Infine la sinergia tra le specie reattive dell'azoto (RNS), ONOO^- , N_2O_3 e le specie reattive dell'ossigeno (ROS) è responsabile dell'aumento dell'effetto citotossico dell'NO a livello cellulare.

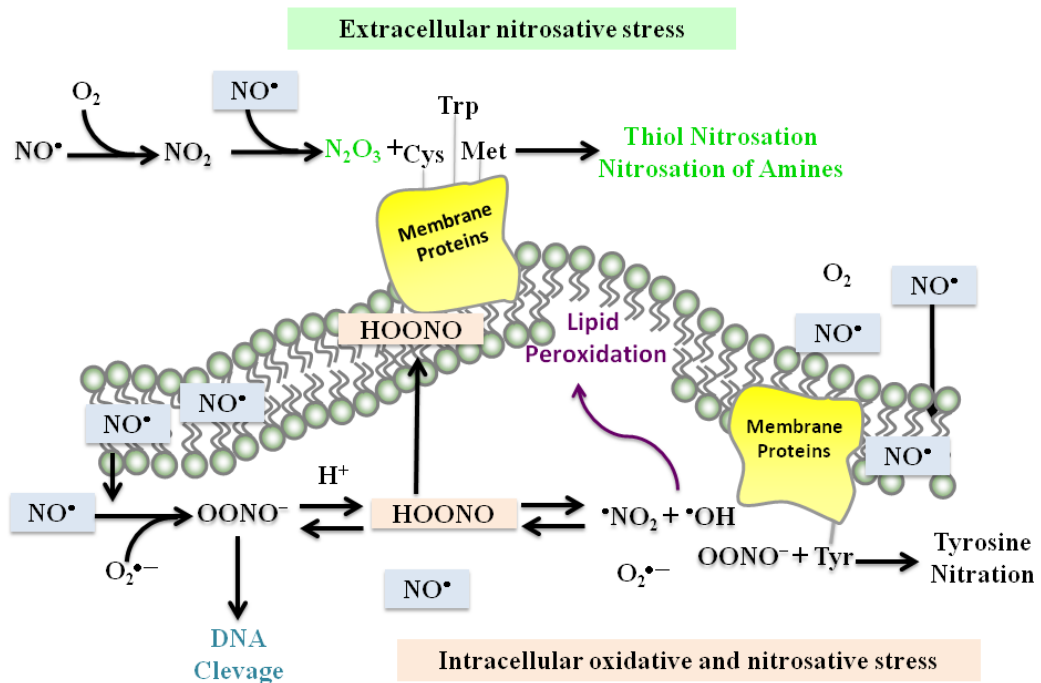


Fig.1.12: Meccanismi citotossici dell'NO e dei suoi metaboliti.

1.6 Ruolo dell'NO nella patogenesi tumorale.

La relazione tra l'NO e la patogenesi tumorale dipende da diverse variabili come la quantità di NO rilasciata e la sua emivita all'interno della cellula,³² infatti elevate concentrazioni di NO determinano un effetto negativo sulla proliferazione tumorale. L'effetto tumoricida è ascrivito alla presenza di RNS, prodotti dalla reazione tra NO e O₂, che causano stress ossidativo, deamminazione del DNA, nitrosilazione di enzimi coinvolti nella sintesi del DNA, un aumento dei processi infiammatori, inibizione della respirazione mitocondriale e promozione dell'apoptosi. Invece basse concentrazioni di NO determinano un'inibizione dell'apoptosi cellulare, la promozione di processi di angiogenesi, che sono finalizzati all'aumento del trasporto di nutrienti facilitando la crescita tumorale.³³ A tal proposito sono state evidenziate elevate concentrazioni delle 3 isoforme di NOS in tumori solidi umani, ciò indica che l'NO è in grado di promuovere la proliferazione tumorale.³⁴ Da studi recenti è stato riscontrato che l'NO è in grado di interferire con la farmaco-resistenza alla chemioterapia anti-tumorale.¹⁵ Infatti, fra i diversi meccanismi coinvolti nella farmaco-resistenza, il più importante è l'up-regulation delle pompe di efflusso nelle cellule tumorali ormai divenute resistenti alla chemioterapia. Queste pompe sono in grado di espellere all'esterno del lume cellulare il farmaco. Le MRP-3 (multiple drug resistance-associated proteins) sono pompe di efflusso che vengono inibite dalla nitratura dei loro residui tirosinici ad opera dell'NO, impedendo lo sviluppo di farmaco-resistenza.³⁵

Nella **Tabella 1** sono riassunti i meccanismi dell'NO nell'inibizione della proliferazione tumorale:²²

Tabella 1

Ruolo NO	Meccanismo
Effetto citostatico o citotossico sulle cellule tumorali.	<ul style="list-style-type: none">• Inibizione della respirazione;• Inibizione della sintesi di DNA;• Attivazione delle caspasi, up-regulation del p53, alterazione delle proteine coinvolte nell'apoptosi

È rilevante l'effetto dell'NO sull'up-regulation del p53, in grado di stimolare il processo apoptotico,³⁶ probabilmente questo processo viene facilitato dall'elevata concentrazione dell'NO all'interno delle cellule tumorali.

Nella **Tabella 2** sono riassunti i meccanismi dell'NO nella promozione della proliferazione cellulare:²²

Tabella 2

Ruolo NO	Meccanismo
Meccanismi genotossici	<ul style="list-style-type: none">• Generazione di specie tossiche e mutagene;• Inibizione della riparazione del DNA;
Effetto antiapoptotico	<ul style="list-style-type: none">• Alterazione genica del p53;• Inibizione dell'attività delle caspasi attraverso nitrosilazione dei residui cisteinici;• Attivazione delle COX;
Induzione dell'angiogenesi	<ul style="list-style-type: none">• Rilascio del VEGF;• Aumento della permeabilità vascolare;• Attivazione della COX2 che stimola la produzione di fattori proangiogenetici e catalizza la sintesi di prostaglandine;

Le attuali terapie farmacologiche influenzano la produzione e concentrazione di NO secondo 2 approcci terapeutici:

- Farmaci che alterano la normale sintesi enzimatica di NO
- Farmaci che promuovono il rilascio di NO utilizzando donatori di NO esogeni

I composti sviluppati in questo progetto di ricerca sono stati sintetizzati soddisfacendo il secondo approccio terapeutico. Ricercando agenti PRO-NO in grado di aumentare la concentrazione di NO all'interno delle cellule tumorali favorendo di conseguenza l'apoptosi o la necrosi tumorale.³⁷

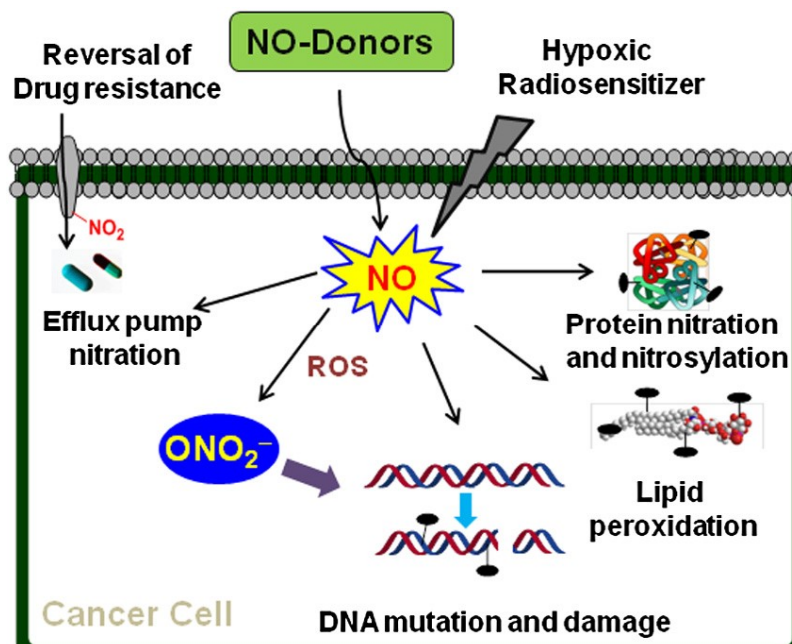


Fig.1.13: Effetti cellulari dovuti ad un'esposizione prolungata all'NO.

1.7 Composti NO-caged

I *caged compounds* sono sonde stimolo-sensibili capaci di incapsulare biomolecole in forme inattive che grazie ad un input opportuno, rilasciano la molecola intrappolata consentendo la perturbazione di un determinato processo biologico.³⁸

A causa dell'instabilità dell'ossido nitrico (NO) e la conseguente difficoltà nell'applicare NO direttamente nel sistema biologico, sono stati sviluppati diversi donatori di NO e usati per studi biologici. Questi sistemi di intrappolamento riescono a rilasciare NO attraverso una reazione di decomposizione spontanea senza però garantire una misurazione della quantità di NO rilasciata, la velocità e la posizione di rilascio.³⁹ Attraverso la strategia di intrappolamento è possibile controllare il rilascio di NO fornendo uno stimolo appropriato.³⁷ Il calore è una possibile soluzione per controllare attivamente il rilascio di NO, ad esempio attraverso l'utilizzo di liposomi termo-sensibili per il deposito, trasporto e rilascio di NO.⁴⁰ Il meccanismo di rilascio comprende la generazione di un gradiente di pH attraverso il doppio strato fosfolipidico liposomiale, il conseguente ingresso di protoni che inducono il rapido rilascio del diazenium-diolato come precursore di NO.⁴¹ (**Fig.1.14**)

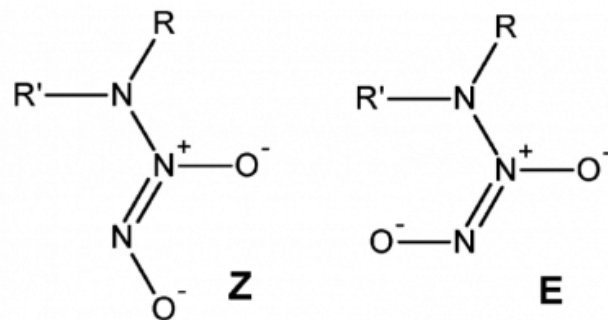


Fig.1.14: Diazenium-diolato.

Ad oggi la luce è il più accurato mezzo d'innescò ON/OFF in grado di regolare il rilascio di NO⁴² nello spazio e nel tempo, senza influenzare parametri fisiologici come pH, temperatura e forza ionica.⁴³

I composti NO-*caged* includono gruppi cromofori come reporter e gruppi donatori di NO che si attivano tramite irradiazione luminosa, con l'obiettivo di quantificare l'ossido nitrico foto-rilasciato all'interno della cellula. Un composto foto-attivo ideale deve rispettare determinati requisiti:

1. I centri foto-attivi devono assorbire a lunghezze d'onda superiori a 300nm;
2. Ottima idrosolubilità;
3. Inattivi in assenza di luce;

Un recente studio condotto da Sortino *et al* ha riportato lo sviluppo di composti NO-*caged*, dove il gruppo donatori di NO è coniugato ad un gruppo con proprietà intercalanti sul DNA. Questa strategia potrebbe rappresentare un valido metodo per foto-generare NO nelle vicinanze del DNA, consentendo il rilascio mirato dell'NO. Il coniugato molecolare è composto da 2 unità cromofore: la porzione antracénica con proprietà intercalanti e il derivato nitro-anilínico che agisce da donatore di NO in seguito ad irradiazione con luce UV. Inoltre vi è un gruppo amminico secondario protonato a pH fisiologico, che aumenta l'idrosolubilità e favorisce il legame con il DNA, tramite interazioni coulombiane con i gruppi fosfato.⁴⁴

Il meccanismo di rilascio dell'NO consta di diversi steps:

- Il nucleo antracénico (unità a) viene foto-eccitato con luce UV e agisce come reporter della sua emissione di fluorescenza;
- Il trasferimento di energia all'unità nitro-anilínica (unità b) consente il rilascio di NO;

- La fluorescenza emessa dal nucleo antracenicico agisce da marker per il rilascio di NO;
- La fine dell'emissione di fluorescenza e il rilascio di NO sono causate dal nucleo nitro-anilinicico;

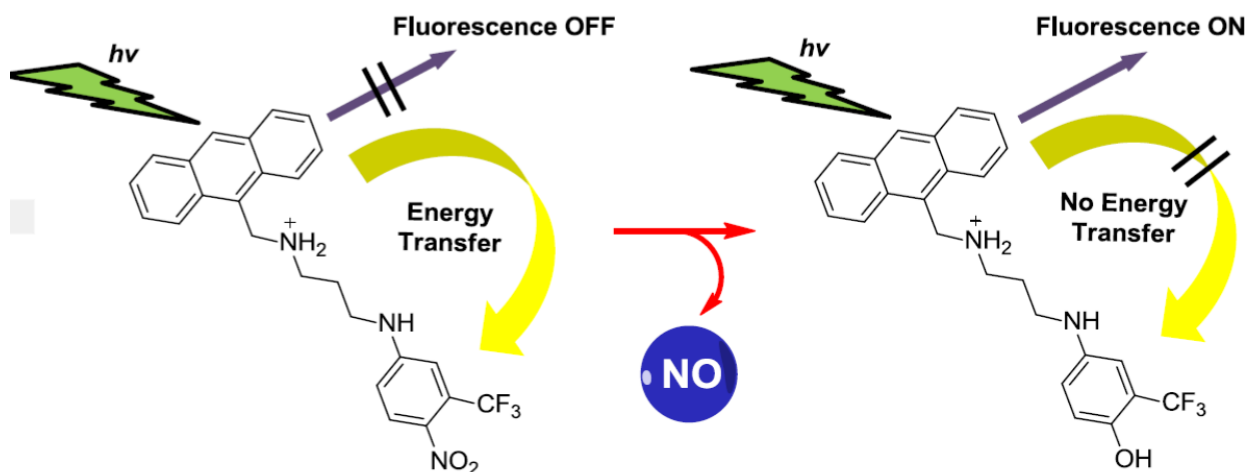


Fig.1.15: Meccanismo di foto-conversione dell'unità b in unità c con conseguente emissione di fluorescenza e simultanea formazione di NO.

I singoli componenti, il gruppo antracenicico e il nucleo nitro-anilinicico, mostrano bande di assorbimento differenti. (**Fig.1.16 A**)

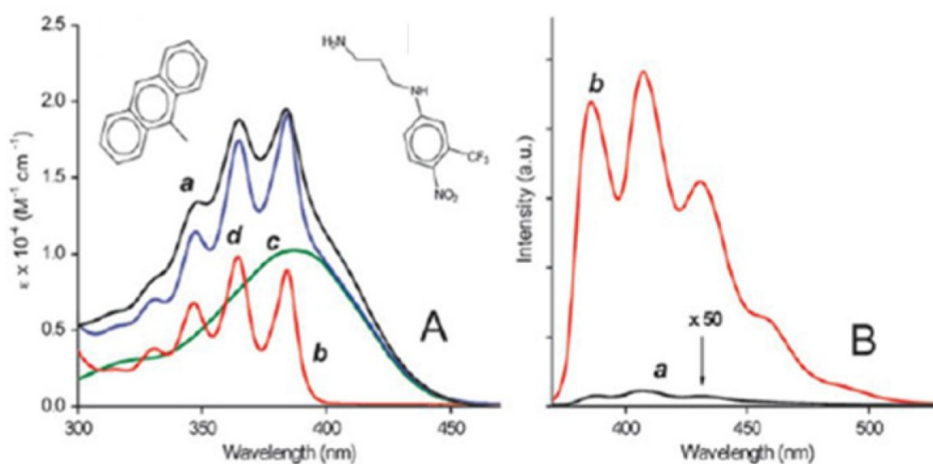


Fig.1.16 A e B.

L'emissione di fluorescenza da parte della porzione antracenicica cessa a causa della presenza del nucleo nitro-anilinicico, che a sua volta assorbe la luce emessa dal nucleo antracenicico, rilasciando NO.

(Fig.1.16 B) In Fig.1.16 B viene riportato lo spettro di emissione del solo gruppo antracenic (b), mentre in basso è visibile la bassa emissione (a) della molecola dopo il rilascio di NO. Requisiti fondamentali per consentire questo trasferimento sono il più basso stato di singoletto eccitato della porzione antracenic che deve essere superiore a quello della porzione nitro-anilinic, inoltre lo spettro d'emissione dell'antracene si deve sovrapporre all'assorbimento dell'anilina.

L'esperimento è stato condotto con due differenti lunghezze d'onda, 420 e 380nm. La quantità di NO rilasciato in entrambe le esperienze è significativamente differente, si aggira intorno a 0.3nM s^{-1} e 0.8nM s^{-1} rispettivamente a 420nm e a 380nm.⁴² La quantità di NO rilasciato a 380nm è dovuta al trasferimento di energia foto-indotto dall'antracene all'anilina, oltre all'assorbimento intrinseco dell'antracene. Il rilascio di NO comporta, di conseguenza, la soppressione dell'emissione di fluorescenza da parte dell'antracene, rendendo il coniugato intrinsecamente non fluorescente.

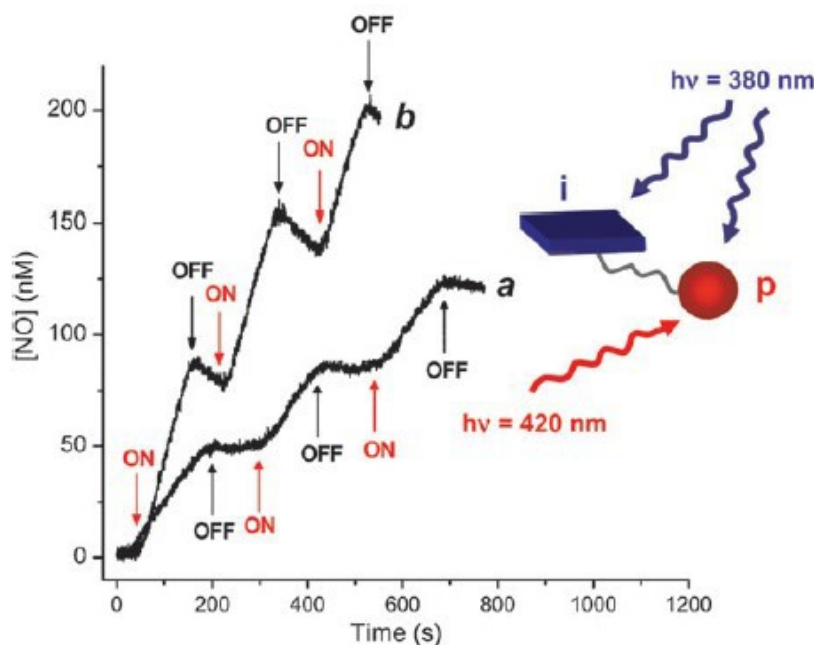


Fig.1.17

La Fig.1.17 mostra l'andamento lineare del rilascio di NO, che prontamente viene interrotto quando la foto-induzione viene spenta e viceversa ricomincia quando la foto-eccitazione riprende, ottenendo evidenze inequivocabili del rilascio foto-indotto di NO dal coniugato.⁴² Inoltre il rilascio di NO controllato dalla luce è stato valutato sia *in vitro* che *in vivo*.

In un recente studio di Rapozzi e collaboratori, sono stati progettati nuovi coniugati molecolari, come DR2, che rappresenta un altro esempio di composti NO-caged attivati dalla luce. DR2 è costituito da un fotosensibilizzatore, il feoforbide a (Pba), è un derivato della clorofilla, che viene spesso utilizzato

come fotosensibilizzatore nella terapia foto-dinamica (PDT) per il trattamento di alcune forme tumorali. Inoltre DR2 è coniugato ad un antiandrogenico non steroideo attraverso un piccolo linker peghilato. DR2 rappresenta un valido approccio per il trattamento del tumore prostatico, basato sulla produzione foto-indotta di ossigeno ed NO *in vitro*.⁴⁵ Inoltre è in grado di legarsi in maniera efficace al recettore androgenico (AR) e di rilasciare NO sotto il controllo esclusivo della luce, grazie alla presenza del 2-trifluorometil-nitrobenzene, catalizzando di conseguenza la sua azione citotossica e migliorando l'effetto foto-dinamico. DR2 è in grado di donare NO attraverso una reazione di foto-riarrangiamento da nitro a nitrito che si verifica con una foto-irradiazione controllata a 400nm.⁴⁵

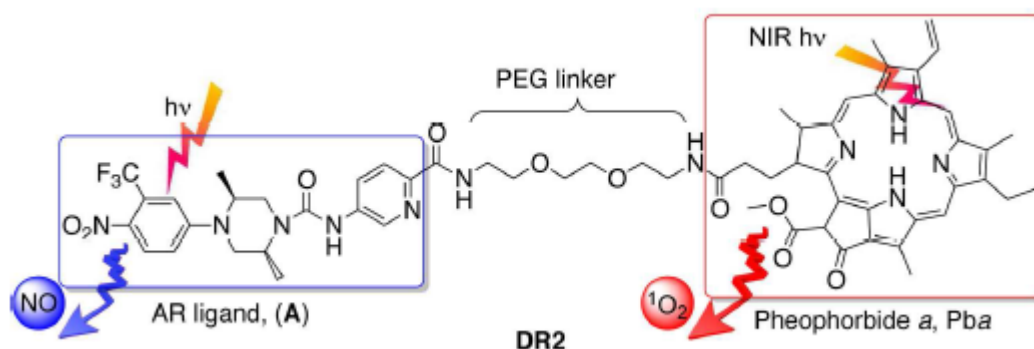


Fig.1.18: struttura chimica di DR2.

1.8 Rilascio *in vivo* di NO.

In uno studio condotto da Nakagawa e collaboratori sul rilascio di NO *in vivo*, per capire come sia possibile trasportare NO all'interno dei tessuti, è stato valutato il rilascio *in vivo* di NO da parte del Flu-DNB, molecola donatrice di NO. In prima analisi è stato esaminato il rilascio di NO nelle cellule HCT116 usando la tecnica TPE (two photon excitation), tramite un'irradiazione laser a 325-385nm (UV-A) e successivamente a 735nm vicino l'infrarosso (NIR). Il risultato del primo esperimento ha confermato che il composto Flu-DNB è in grado di rilasciare NO in maniera controllata. **(Fig.1.19)**

Successivamente, è stato esaminato il rilascio foto-indotto di NO all'interno dei tessuti, per questo motivo è stato scelto il tessuto cerebrale di topo come modello, in quanto la superficie del cervello potrebbe essere facilmente accessibile attraverso la formazione di un foro nel cranio.³⁹

Inoltre la foto-irradiazione con un laser con un impulso a femtosecondi ad una lunghezza d'onda NIR, ha permesso di illuminare ristrette aree di campioni biologici causando il minimo foto-danneggiamento, suggerendo questa tecnica come una valida applicazione *in vivo*.³⁹

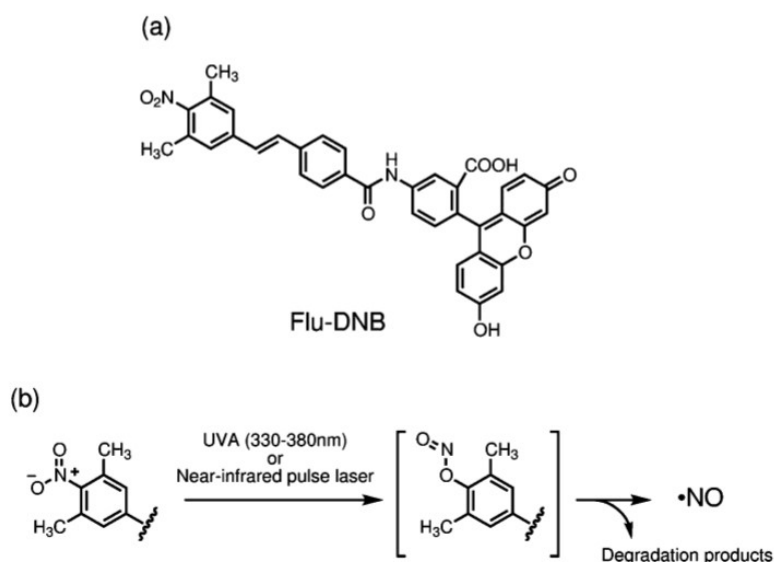


Fig.1.19: (a) struttura chimica del Flu-DNB; (b) meccanismo proposto per il rilascio di NO dopo foto-irradiazione.

È stato anche esaminato il foto-rilascio di NO all'interno dei tessuti attraverso un'irradiazione laser ad una lunghezza d'onda NIR dopo trattamento con Flu-DNB. I topi C57BL/6J sono stati anestetizzati ed è stata aperta una "cranial window", un piccolo foro è stato effettuato all'altezza della *dura madre* senza infiammare il parenchima cerebrale e rivestito con fluido cerebrale artificiale (ACSF) contenente 100nM Flu-DNB e 1% (v/v) di DMSO come co-solvente per 3 ore. (**Fig.1.20**)

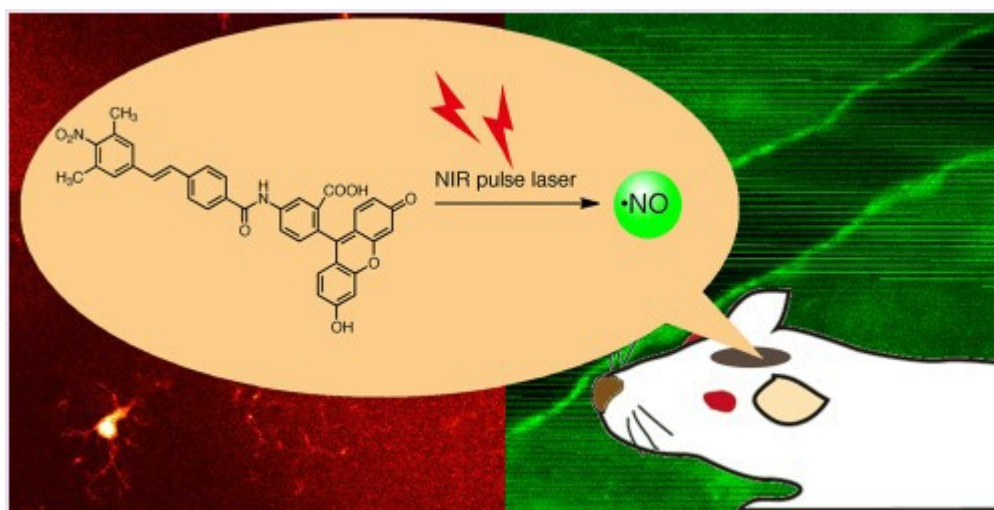
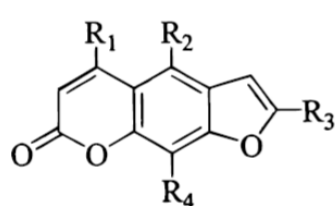


Fig.1.20: rilascio di NO dopo foto-irradiazione NIR nel cervello di topo.

Grazie alla fluorescenza sviluppata da Flu-DNB è stato possibile individuare il principale sito di distribuzione di Flu-DNB, cioè le pareti dei vasi a una profondità di almeno 100 µm dalla superficie del cervello. La foto-irradiazione laser a lunghezza d'onda NIR concentrata sulla parete del vaso sanguigno ha indotto un transitorio, ma significativo, aumento del diametro del vaso dimostrando, di conseguenza, l'effettivo rilascio di NO. Questo risultato è stato, inoltre, confermato dall'uso di un inibitore sGC, in quanto l'effetto vasodilatatorio è NO-cGMP dipendente. Infine, questo metodo consente di manipolare ripetutamente il rilascio di NO in una specifica regione d'interesse per applicazioni *in vivo*.

È possibile riportare alcuni esempi di composti che vengono attualmente usati in foto-terapia, e rappresentano un'ottima strategia per il trattamento di diverse patologie maligne e pre-maligne. Si deve considerare che alcuni di questi composti usati nella pratica clinica possono creare dei foto-danneggiamenti tissutali irreversibili.

Lo Psolarene è il capostipite di una famiglia di composti organici naturali noti come furanocumarine lineari, esso deriva formalmente dalla cumarina mediante l'aggiunta di un anello furanico e può essere considerato come un derivato dell'umbelliferone. Lo Psolarene è stato usato in associazione con irradiazione UVA per il trattamento clinico, conosciuto come terapia PUVA (terapia con luce UVA per il trattamento di eczemi, psoriasi e linfomi cutanei), per il trattamento di patologie dermatologiche.⁴⁶



Psoralen	(R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =H)
5-Methoxypsoralen (5-MOP)	(R ₂ =OCH ₃)
8-Methoxypsoralen (8-MOP)	(R ₄ =OCH ₃)
4,5',8-Trimethylpsoralen (458-TMP)	(R ₁ =R ₃ =R ₄ =CH ₃)

Fig.1.21: struttura chimica Psolarene e derivati usati in terapia.

Molti trattamenti dermatologici sono basati sull'uso dell'8-metossipsolarene (8-MOP) che viene generalmente usato per la sua attività foto-terapeutica inibitoria della replicazione del DNA per irradiazione UV a 355nm. Esso è in grado di indurre un trasferimento elettronico con conseguente formazione di un radicale cationico attraverso un processo di foto-ionizzazione laser. Questa strategia è di particolare importanza a causa delle reazioni di trasferimento elettronico di cationi radicalici

dell'8-MOP alle basi puriniche del DNA. Alla luce di queste osservazioni, il trasferimento di elettroni svolge un ruolo sia nell'effetto foto-terapeutico che foto-tossico degli psoraleni e substrati correlati, che vengono utilizzati in foto-chemioterapia.⁴⁶

Un altro composto che viene usato in foto-terapia è il Padoporfina (Tookad) che nel 2013 è entrato nella fase clinica III per la foto-terapia dinamica (PDT) del cancro prostatico. Tookad è un derivato foto-sensibile della clorofilla batterica, dotato di forte assorbanza nel NIR (763nm), in grado di penetrare anche nei tessuti più profondi.⁴⁷ (**Fig.1.22**)

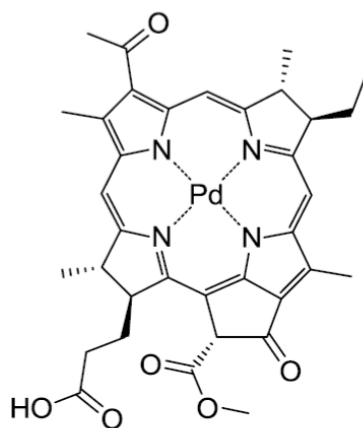


Fig.1.22: struttura chimica Tookad.

In generale, un foto-sensibilizzatore è una molecola che dopo foto-irradiazione ad una lunghezza d'onda appropriata viene convertito nel suo stato di singoletto eccitato, infatti Tookad è in grado di provocare la generazione di ROS. Il protocollo foto-terapeutico con Tookad ha come obiettivi la generazione di ipossia, necrosi ed eradicazione tumorale. La foto-irradiazione può essere fruita su tutto il tessuto prostatico e su organi metastatizzati utilizzando una diffusione con fibre ottiche.⁴⁸

1.9 Ligand-Targeted

Recentemente, nuovi farmaci anti-proliferativi sono costituiti da un'unità *target* in grado di indirizzare selettivamente l'agente citotossico all'interno delle cellule tumorali.⁴⁹ La struttura generale di questa nuova classe di farmaci è formata da una frazione terapeuticamente attiva legata all'unità *target* (gruppo aptoforo) tramite uno spaziatore, che di solito contiene legami facilmente idrolizzabili (Fig.1.23).

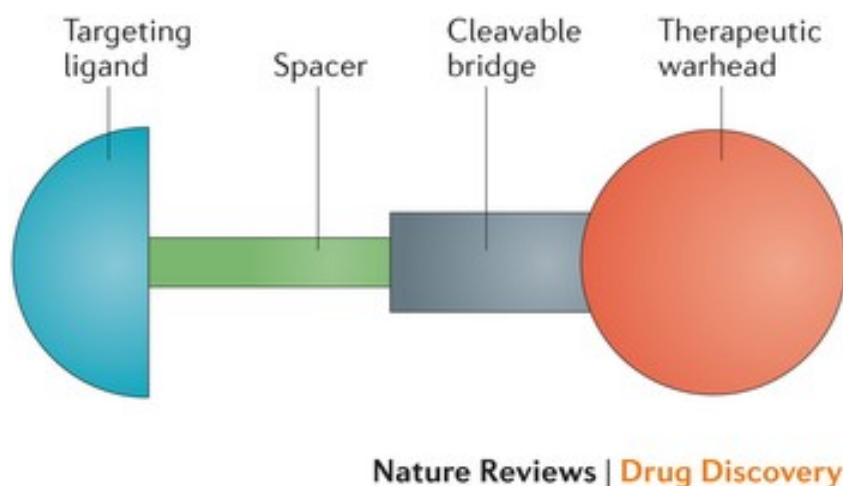


Fig.1.23: Un esempio di composto ligand-targeted.

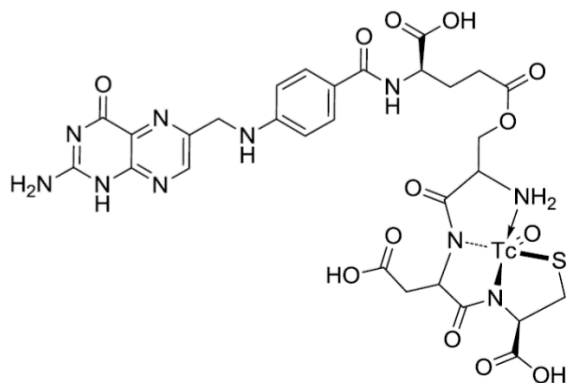
Una grande varietà di gruppi aptofori è costituita da anticorpi, aptameri, piccole proteine o peptidi a basso peso molecolare.^{50,51} L'efficacia di questi composti dipende dalla potenza del coniugato terapeutico e dal numero di recettori bersaglio disponibili all'internalizzazione nelle cellule tumorali. La sicurezza, invece, dipende dalla specificità del *target* per le cellule cancerose, in modo tale da garantire un'ottima biodistribuzione ed una riduzione della tossicità. Un parametro importante è l'over-espressione dei recettori bersaglio sulle cellule tumorali⁵² per garantire l'endocitosi di una quota terapeuticamente attiva del farmaco. Per esempio i livelli di espressione dei recettori dell'acido folico (FR α) potrebbero essere superiori a 2.8 milioni di recettori per cellula tumorale.⁵³ Altro esempio di recettori che sono over-espressi sulle cellule tumorali è rappresentato dai recettori σ .⁵⁴

Infine la tossicità intrinseca degli agenti terapeutici e la loro biodistribuzione all'interno delle cellule cancerose sono fondamentali per garantire l'efficacia del coniugato *ligand-targeted*. A tal proposito il coniugato terapeutico deve rispettare determinati parametri:

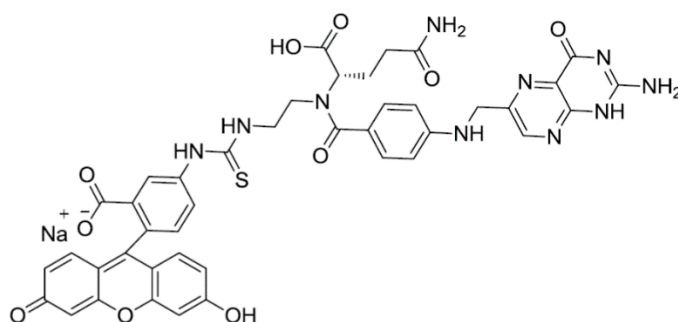
- Elevata potenza, per esempio il ligandi dei FR α mostrano un valore di $IC_{50} < 10^{-8}$ che si dimostra sufficiente per un numero di recettori di 10^6 per cellula tumorale;

- Un meccanismo d'azione che non comporta farmaco-resistenza;
- La quota di farmaco attiva all'interno della cellula non deve subire incapsulamento in vescicole endosomiali, ciò è permesso da un'ottima capacità di attraversare la membrana plasmatica;

Recentemente molti coniugati *ligand-targeted* sono entrati in fase di sperimentazione clinica come EC17 e Etarfolatide.⁵⁵



Etarfolatide



EC17

Questi studi sono stati lo spunto per sviluppare ligandi ibridi σ /NO, sfruttando soprattutto l'over-espressione dei recettori σ sulle cellule tumorali e la capacità dei ligandi ad indurre apoptosi tumorale, salvaguardando le cellule sane e potenziando l'effetto citotossico grazie al rilascio fotoattivato dell'NO (**Fig.1.24**).

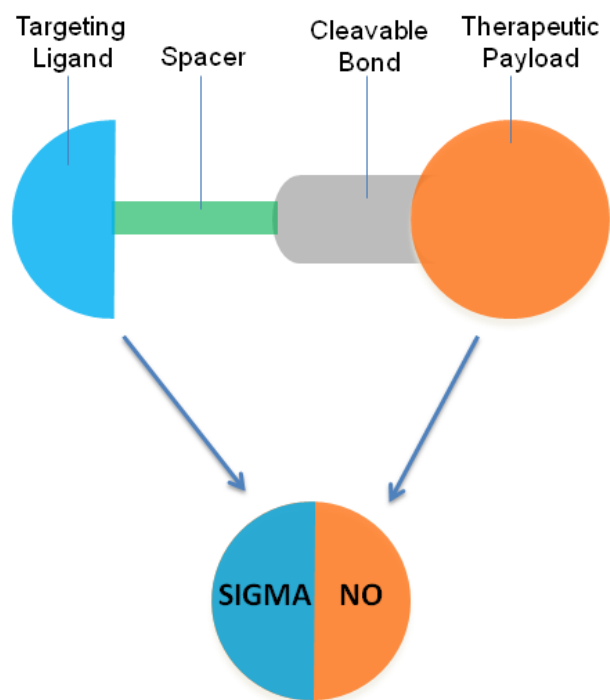


Fig.1.24 Ligandi ibridi σ /NO.

1.10 Recettori Sigma.

I primi studi sui recettori sigma (σ) furono condotti da Martin e collaboratori già all'inizio degli anni settanta, al fine di conoscere la loro funzione biologica e localizzazione anatomica. Originariamente i recettori sigma furono annoverati tra i recettori oppioidi, in virtù della loro affinità di binding nei confronti del derivato a struttura benzomorfanica ad azione psicotomimetica, SKF-10,047 (*N*-allil-Normetazocina). Questo composto è considerato come il prototipo dei ligandi σ , infatti il nome di questa classe recettoriale origina dalla prima lettera "S" del composto SKF-10,047.⁵⁶ Da studi successivi, invece, fu evidenziato che l'isomero levogiro si legava principalmente ai recettori oppioidi μ e κ ed i suoi effetti venivano antagonizzati dal naloxone, mentre l'isomero destrogiro interagiva con il sito σ producendo un effetto che non veniva antagonizzato da antagonisti oppioidi.⁵⁷⁻⁶⁰ (Fig. 1.25). Era quindi evidente che il recettore σ non può essere classificabile tra i recettori oppioidi.

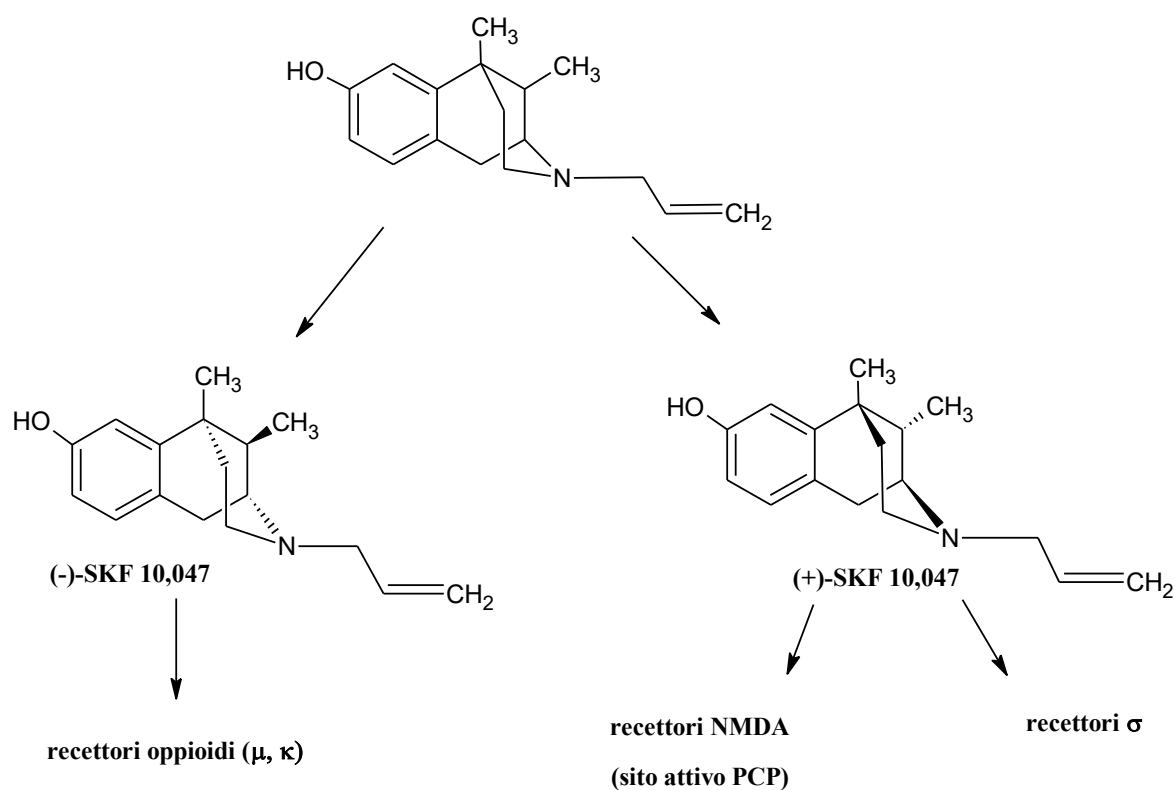


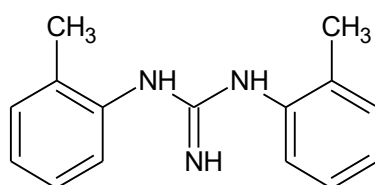
Fig.1.25: Struttura chimica ed enantiomeri di SKF-10,047.

In seguito fu evidenziata la capacità dell'isomero destrogiro del ligando (+)-SKF-10,047 di legarsi al sito di legame per la Fenciclidina (PCP), presente nel recettore glutammatergico NMDA, oltre che per i siti che non rispondevano ad antagonisti oppioidi, come il Naloxone. Inoltre, considerata l'affinità di legame della PCP per il recettore σ , si ipotizzò l'esistenza di un sito coincidente " σ -PCP", tesi che venne smentita dalla dimostrazione che la [³H]-PCP si legava ad un sito integrato nel recettore NMDA, mentre il [³H]-(+)-SKF-10,047 si legava ad un sito differente.⁶¹⁻⁶³

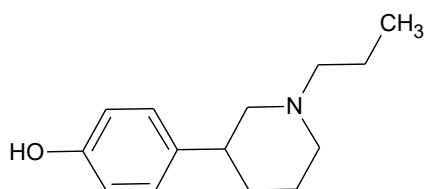
Tali considerazioni hanno permesso di differenziare in maniera netta i recettori σ dai recettori oppioidi e dai recettori NMDA.

Ulteriori studi di *binding* hanno mostrato un'elevata affinità di legame dei recettori σ nei confronti di molti farmaci neurolettici, come il derivato butirrofenonico, Aloperidolo. Questo composto esibisce un'elevata affinità σ ($2,2 \text{ nM} \leq K_i \leq 16 \text{ nM}$), inibendo il legame del [^3H]-SKF-10,047 con una potenza almeno 10 volte superiore rispetto a quella esibita nei confronti del recettore dopaminergico D_2 .⁶⁴

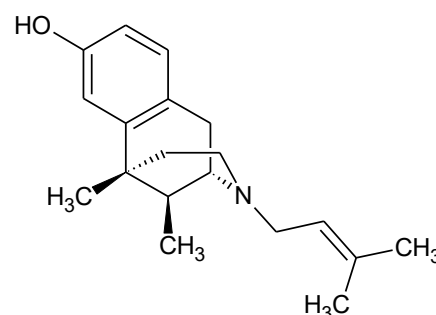
Le ricerche condotte da Bowen e collaboratori hanno portato alla suddivisione dei recettori in due sottotipi: recettori σ -1 (σ_1) e recettori σ -2 (σ_2). I due sottotipi recettoriali si differenziano tra loro a causa delle differenti caratteristiche di affinità, selettività, funzione, architettura molecolare, localizzazione e meccanismi biochimici connessi con la loro attivazione.⁶⁵⁻⁶⁷ È stato anche riportato un profilo di legame differente per i due sottotipi recettoriali. Il recettore σ_1 mostra infatti stereospecificità nei confronti degli isomeri destrogi dei benzomorfini, quali Pentazocina, Ciclazocina e SKF-10,047, il recettore σ_2 mostra selettività per gli isomeri levogiri.⁶⁸⁻⁶⁹ Saggi di binding in vitro hanno evidenziato un'elevata affinità dei recettori σ_1 per alcuni farmaci neurolettici, come l'Aloperidolo, l'Imipramina, la Fluvoxamina, il Pimozide e la Clorpromazina.⁷⁰ Entrambi i sottotipi recettoriali mostrano elevata affinità per l'Aloperidolo ($K_i \sigma_1 = 2.2 \text{ nM}$; $K_i \sigma_2 = 16.0 \text{ nM}$) e la 1,3-di-(2-tolil)-guanidina (DTG) ($K_i \sigma_1 = 27.7 \text{ nM}$; $K_i \sigma_2 = 12.8 \text{ nM}$). Tra i ligandi σ_1 selettivi, annoveriamo AC-915, lo Spipethiane, il PD-144418, e SA-4503 mentre PB-28, CB-184, Ibogaina e Ifenprodil sono selettivi per il recettore σ_2 .



DTG



3-PPP



Pentazocina

1.11 Recettore Sigma-1.

Il recettore σ_1 risulta farmacologicamente ben caratterizzato, in quanto si conoscono sia la sequenza amminoacidica che i ligandi selettivi. E' stato purificato e clonato per la prima volta nel 1996 da cellule epatiche di *Guinea Pig*;⁷¹ successivamente è stata clonata e caratterizzata anche la proteina umana,⁷² di ratto⁷³ e di topo.⁷⁴ Questo sottotipo recettoriale è costituito da un singolo polipeptide di 223 aminoacidi, con una massa molecolare di 25-28 kDa, Sono stati proposti diversi modelli strutturali del recettore σ_1 . Inizialmente, si pensava che la struttura del recettore fosse costituita da un singolo dominio transmembrana,⁷⁵ ma studi recenti condotti da Aydar e collaboratori hanno evidenziato che il recettore σ_1 presenta nella membrana plasmatica due domini transmembrana (uno vicino all'estremità N-terminale e l'altro verso il centro della proteina); quindi, a differenza del primo modello, abbiamo entrambi le estremità N-terminale e C-terminale localizzate sul lato citoplasmatico⁷⁶ (Fig.1.26).

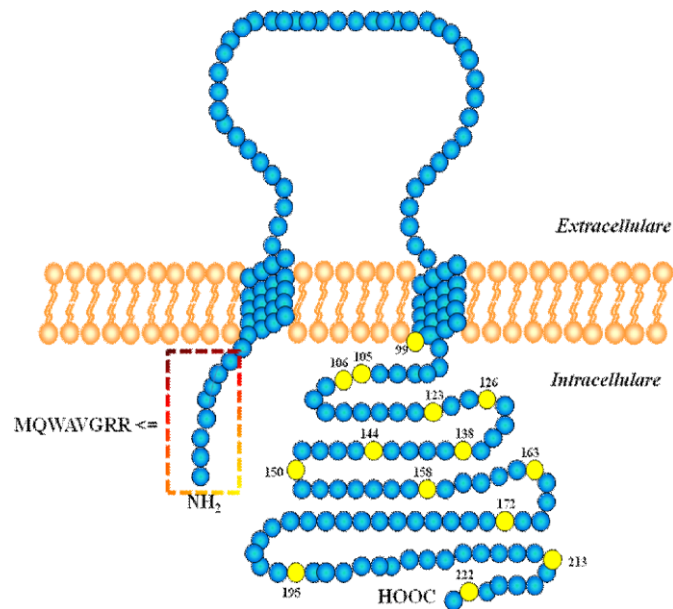


Fig.1.26: Modello di Aydar a due domini.

Recentemente, grazie al gruppo di ricerca di Pal, in aggiunta alle due regioni idrofobiche rappresentate dai due domini transmembrana, è stata ipotizzata l'esistenza di due segmenti idrofobici, uno dei quali è parzialmente sovrapposto al dominio transmembrana. Tali domini rappresentano un secondo sito di legame sul recettore σ_1 selettivo per ligandi a struttura steroidea e sono indicati come: *STEROID BINDING DOMAIN LIKE-I* (SBDLI) e *STEROID BINDING DOMAIN LIKE-II* (SBDLII) (Fig. 1.27).⁷⁷

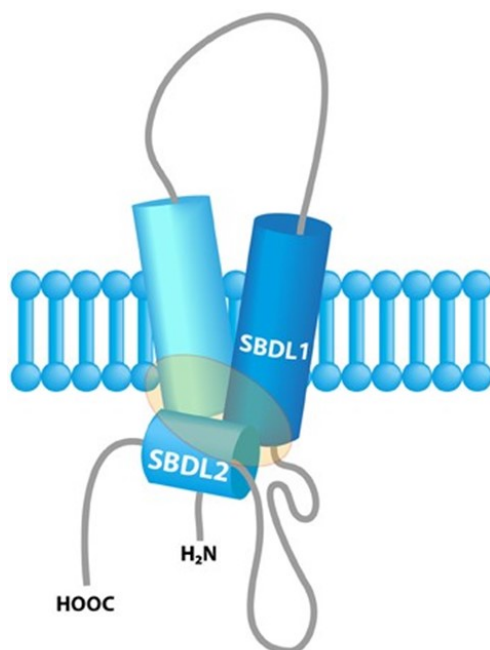


Fig.1.27: Modello del recettore σ_1 . L'area circolare include i domini idrofobici. Aspartato 188 (D188) in SBDL II è stato identificato come parte del sito di legame della cocaina.

Il gene che codifica per il recettore σ_1 è localizzato sul cromosoma 9 umano, contiene quattro esoni e tre introni, e la sua lunghezza totale di 7 kbp. Il sito d'inizio della trascrizione si trova sull'esone 1 ed il codone d'arresto sull'esone 4, invece l'esone 2 codifica per il dominio transmembrana;⁷⁸ inoltre, è stata identificata una variante di *splicing* del gene che manca dell'esone 3 e non è in grado di legare ligandi σ .⁷⁹ La clonazione del recettore σ_1 e di conseguenza la conoscenza della sequenza amminoacidica, ha permesso di individuare alcuni aminoacidi essenziali per l'interazione dei ligandi con il recettore. La sostituzione di aminoacidi presenti nel dominio transmembrana ha evidenziato una ridotta affinità sia agonisti che di antagonisti, definendo un ruolo critico di questa regione nell'interazione con i ligandi σ_1 . Solo studi successivi, hanno dimostrato che gli aminoacidi critici per il legame al recettore si trovano nella porzione C-terminale piuttosto che nel dominio transmembrana, e corrispondono ai residui di Asp126 e Glu172.⁸⁰ Tramite diversi studi di localizzazione anatomica, eseguiti mediante l'utilizzo di procedure radiografiche, quali *binding*, tecniche autoradiografiche, di *imaging* e *Northern Blot*, i recettori σ_1 risultano distribuiti in diverse aree del sistema nervoso centrale, in diversi organi periferici ed anche in alcuni siti sub-cellulari.⁸¹ A livello centrale, i recettori σ_1 mostrano un'elevata concentrazione nei nuclei motori del tronco encefalico, nei nervi cranici, nel cervelletto e nel nucleo rosso, e di conseguenza risultano coinvolti nei processi motori. La presenza di tali recettori, invece, nella regione limbica, nel giro dentato, nell'ipotalamo e nella *substantia nigra*, hanno evidenziato il loro ruolo nei processi di apprendimento,

memoria e nelle funzioni cognitive.⁸²⁻⁸³

La popolazione recettoriale σ_1 è in grado di potenziare la trasmissione glutammatergica, colinergica e serotoninergica, modulare negativamente il sistema GABAergico, ridurre il release di noradrenalina, modulare la trasmissione dopaminergica e la trasmissione oppioidergica mediata quindi dai peptidi oppioidi endogeni.⁸⁴⁻⁸⁷

Per quanto concerne la trasmissione glutammaergica, gli effetti modulatori del recettore σ_1 sono stati dettagliatamente descritti, evidenziando un incremento del release di glutammato nell'ippocampo sia spontaneo che BDNF-indotto (Brain Derived Neurotrophic Factor), un massivo aumento di $[Ca^{2+}]_i$ a livello piramidale e una facilitazione dei meccanismi di Long-Term Potentiation (LTP) a livello dell'ippocampo del ratto.⁸⁸

Tra i differenti ruoli invece, svolti da tali recettori, nei confronti della trasmissione dopaminergica, vi è sicuramente il documentato coinvolgimento negli effetti indotti dalle sostanze d'abuso, evidenziandolo quindi come potenziale *target* terapeutico nel contrastare forme patologiche di dipendenza dalle suddette sostanze, ed in particolar modo dalla cocaina.

L'assunzione di tale sostanza infatti, porta ad un incremento massivo di diverse neurotrasmissioni, ed in particolar modo, proprio quella dopaminergica, in quanto il suo meccanismo d'azione prevede l'inibizione del trasportatore DAT della dopamina (anche del SERT e NET seppur in misura minore), localizzato sul terminale presinaptico del neurone dopaminergico, preposto al *reuptake* del neurotrasmettitore stesso.

Questo, determina pertanto un aumento di concentrazione della dopamina nello spazio sinaptico a tutti i livelli, centrali e periferici, portando ad una iper-stimolazione dei recettori dopaminergici, decretandone quindi gli effetti deleteri conosciuti.

L'ipotesi del coinvolgimento dei recettori σ_1 , negli effetti mediati dalla cocaina, fu evidenziata da Matsumoto e collaboratori, i quali appurarono che tale droga interagisce anche con la suddetta popolazione ad una concentrazione analoga a quella richiesta per bloccare il suo *target* DAT. In aggiunta essi evidenziarono che la somministrazione di antagonisti del recettore σ_1 come l'aloiperidolo, il BD-1008, il BMY 14802 ed altri, erano in grado di inibire efficacemente gli effetti stimolanti, convulsivi e dunque letali indotti da una overdose di cocaina.

Tuttavia Navarro e collaboratori, successivamente, hanno messo in evidenza come il coinvolgimento dei recettori σ_1 a tal proposito sia molto più profondo, identificando una vera e propria interazione molecolare e funzionale tra i recettori σ_1 e il D1 dopaminergico, sia a livello pre che post-sinaptico. Tecniche infatti come la BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer-based*), in combinazione con la BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*), hanno fatto emergere l'esistenza di un'interazione tra i recettori σ_1 e D1, capace di formare un eterotrimerico costituito da

un'unità σ_1 e da due unità D_1 , identificato pertanto come possibile *target* nel trattamento dell'assuefazione da cocaina.

Considerato quindi l'elevata influenza dei recettori σ_1 in diversi sistemi neurotrasmettitoriali, e visto, nei paragrafi precedenti, la ampia distribuzione degli stessi a vari livelli nel SNC, appare chiaro che i ligandi σ_1 rappresentino dei promettenti *tools* farmacologici utili in differenti campi terapeutici come i disturbi d'ansia e depressione, deficit della memoria e apprendimento, patologie psicotiche, dipendenza da droghe e chiaramente il dolore, in particolar modo cronico.

La caratteristica infatti degli agonisti σ_1 di potenziare il *firing* dei neuroni serotoninergici, mostra effetti antidepressivi in modelli comportamentali, rendendoli quindi potenziali strumenti nel trattamento dei disturbi dell'umore; così come il coinvolgimento nella neurotrasmissione colinergica e glutammatergica, gioca un ruolo cruciale nelle funzioni dell'apprendimento e memoria, agendo però solo nei casi di squilibrio patologico, rendendoli utili in patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer; infine la loro capacità di influenzare la neurotrasmissione dopaminergica e glutammatergica acquista un importante peso nella fisio-patologia della schizofrenia.⁸⁹⁻⁹⁰

L'utilizzo infatti di composti, con un'elevata selettività nei confronti del recettore σ_1 , hanno permesso di studiare in maniera più approfondita il loro coinvolgimento nelle psicosi e nelle varie manifestazioni schizofreniche permettendo anche di appurare come, in modelli animali, la somministrazione di antagonisti σ_1 porti ad miglioramento di tali sintomi.⁹¹

Il gruppo di ricerca di Laurini e collaboratori ha riportato e convalidato il primo modello di omologia 3D del recettore σ_1 . La sostituzione dei residui aminoacidici Ser⁹⁹, Thr¹⁰³, Leu¹⁰⁵ e Leu¹⁰⁶, tutti appartenenti al cosiddetto *steroid binding domain-like I* (SBDLI), con alanina hanno rivelato che la mutazione Tyr¹⁰³-Ala presenta l'influenza più forte nel legare sia gli agonisti, come la (+)-Pentazocina, che la molecole antagoniste, come NE-100. Una differenza nel legame tra agonisti ed antagonisti è stata rivelata nel caso della tripla mutazione Ser⁹⁹-Ala/Leu¹⁰⁵-Ala/Leu¹⁰⁶-Ala: mentre l'affinità di binding dell'antagonista NE-100 veniva ridotta, il legame della (+)-Pentazocina per il recettore non veniva influenzato. Indagini successive, hanno evidenziato inoltre, che i residui di tirosina nelle posizioni 173, 205 e 206 sono importanti per il legame del colesterolo.⁹² Questo modello è stato utilizzato per caratterizzare il sito di legame di ligandi σ_1 strutturalmente non correlati ed identificare i residui chiave coinvolti nell'interazione recettore-ligando. Secondo tale modello, la proteina è strutturalmente costituita da 2 domini transmembrana (TM) ad α -elica (residui 10-30 e 80-100), un numero di foglietti- β , un'ulteriore α -elica nella metà C-terminale (residui 111-116, 133-135 144-146, 158-164 e 180-200) e diversi *loops*.⁹² Di seguito, viene rappresentata la struttura 3D del recettore σ_1 incorporato nel modello di membrana 1-esadecanoil-2-[(9Z)-ottadecenoil]-sn-glicero-3-fosfolina (POPC) /1-palmitoil-2-oleil-sn-3-glicerofosfo-etanolamina (POPE)/colesterolo in

rapporto (2:2:1)⁹² (Fig.1.28 a, b).

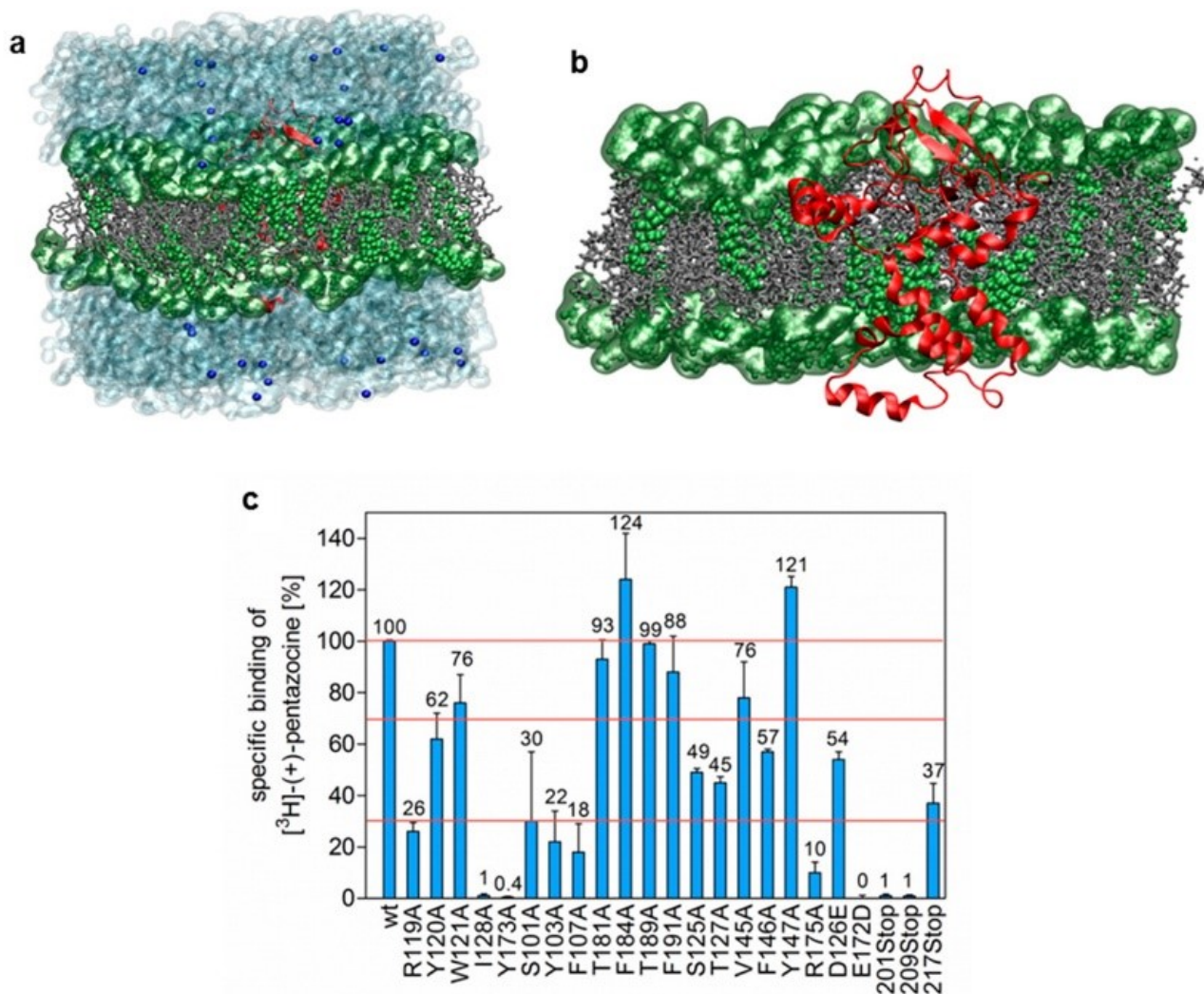
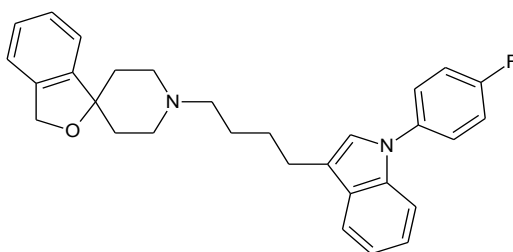


Fig. 1.28 **a)** Struttura 3D del recettore σ_1 incorporato nel modello di membrana POPC/POPE/colesterolo (2:2:1). L'acqua viene mostrata con una luce blu chiaro, mentre gli ioni Cl^- e Na^+ sono visibili come sfere blu scure. Le teste polari dei lipidi POPC e POPE sono ritratte come palline e bastoncini verdi. Le code idrofobe vengono mostrate come bastoncini grigi; le molecole di colesterolo sono evidenziate come sfere verdi, ed il recettore σ_1 viene raffigurato come un nastro rosso. **b)** sezione trasversale del modello recettoriale σ_1 (acqua e ioni non vengono mostrati). **c)** Legame specifico (SB) della [³H]-(+)-pentazocine (PTZ), ad una concentrazione di 40 nM, con le diverse forme alanina-mutanti del recettore σ_1 umano ($n \geq 2$). SB si riferisce al legame della PTZ con il recettore *wild-type* (wt) (100%, prima colonna). Osservando le linee rosse, SB < 30% indica una forte influenza di un particolare aminoacido sul legame del ligando, 30% < SB < 70% indica una moderata influenza sul legame del ligando e SB > 70% indica che non vi è nessuna influenza sul legame del ligando.⁹²

1.12 Recettore Sigma-2

Il recettore σ_2 è di certo strutturalmente e farmacologicamente distinto dal recettore σ_1 , ma a differenza di quest'ultimo non è ancora ben caratterizzato; per tale motivo è stato e continua ad essere oggetto di numerosi studi. Infatti, la proteina recettoriale non è stata clonata e di essa non si conosce la struttura primaria; tuttavia, studi di *photoaffinity labeling* rivelano un peso molecolare di 21.5 kDa.⁹³

Le informazioni relative alla sua distribuzione anatomica sono state ottenute attraverso studi di *binding*; tali studi hanno apportato anche informazioni sulla co-localizzazione dei due sottotipi recettoriali, che risultano presenti in concentrazioni differenti. Studi autoradiografici effettuati in presenza di [³H]-DTG hanno riscontrato la presenza di tali recettori prevalentemente in zone anatomiche deputate alla funzionalità motoria, come il cervelletto, la *substantia nigra*, il nucleo rosso ed i nuclei dei nervi cranici del mesencefalo; si pensa pertanto siano implicati nel controllo della postura e dei movimenti. I recettori σ_2 sono stati individuati anche a livello del fegato, reni e cuore, tessuto endocrino e immunitario.⁹³⁻⁹⁴ Studi relativi alla localizzazione sub-cellulare, effettuati mediante l'utilizzo di marcatori fluorescenti ad alta affinità per i recettori σ_2 , hanno evidenziato la presenza di tali recettori nei mitocondri, nei lisosomi, nell'ER e nella membrana citoplasmatica. Inoltre, è stato dimostrato che il marcatore K05-138 non appena si legava al recettore σ_2 , veniva internalizzato mediante un processo di endocitosi, suggerendo che i ligandi σ_2 possono essere adoperati come agenti chemioterapici.⁹⁵ Recenti studi hanno mostrato che il sito di legame del recettore σ_2 può essere localizzato nella proteina di membrana PGRMC1 (Progesterone Receptor Component 1), che è stato indipendentemente associato con la proliferazione cellulare. Questa stessa proteina risulta anche coinvolta nel legame al P450, ed è in grado di aumentarne l'attività ed incrementare la sintesi del colesterolo. Al fine di dimostrare le analogie tra il recettore σ_2 e il PGRMC1, e quindi sostenere l'ipotesi della presenza del sito di legame di tale recettore all'interno di questo complesso proteico, nel 2011 il gruppo di ricerca di Xu e collaboratori ha eseguito una serie di esperimenti nella linea cellulare HeLa utilizzando saggi di *binding in vitro* e varie tecniche di biologia molecolare.⁹⁶ Questi studi hanno dimostrato che il ligando AG-205 del PGMRC1 e i più noti ligandi σ_2 , DTG e Siramesina, sono in grado di spiazzare un radioligando σ_2 dal proprio sito di legame negli omogenati di membrana delle cellule HeLa. Dai risultati ottenuti si può ipotizzare che i ligandi σ_2 e il ligando della proteina PGRMC1 condividono lo stesso sito di *binding*.



Siramesina

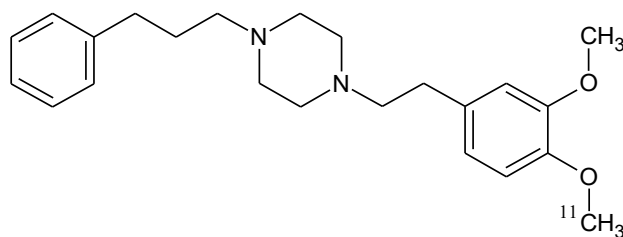
1.13 Ruolo dei sottotipi recettoriali σ_1 e σ_2 nella patogenesi tumorale.

Recenti studi hanno evidenziato l'over-espressione delle popolazioni recettoriali σ_1 e σ_2 in molte linee cellulari tumorali umane, per esempio nel cancro prostatico, nel carcinoma mammario, nel cancro al rene e nel cancro al colon.⁹⁷ Molte di queste considerazioni sono basate su studi di binding di radioligandi dei recettori σ . (Tabella 3)

Tabella 3:

Cell line or tumor tissue	σ receptor drugs tested
Non small-cell lung carcinoma	IPAB, haloperidol, DTG
Large cell carcinoma (NCI-HI299 and NCI-H838)	IPAB, haloperidol, DTG
Lung cancer cell line (NCI-H727)	IPAB, haloperidol, pentazocine, DTG (+/- dexrallorphan)
Brest ductal carcinoma (T47D)	Pentazocine, DTG (+/- dexrallorphan)
Renal carcinoma	DTG
Colon carcinoma	DTG
Sarcoma	DTG
Brain tumor tissue	DTG
(Nude mouse-born) neuroblastoma and glioma	DTG
Rat neuroblastoma (NIE-115), rat glioma (c6)	Pentazocine, DTG (+/- dexrallorphan)
U-138MG glioblastoma	Pentazocine, DTG (+/- dexrallorphan)
Breast cancer cell line (MCF-7, T47D, and SKBr3)	Haloperidol, CB-64D, CB-184, IPAB
Small-cell lung cancer (NCI-H209/N417)	IBP, haloperidol
Neuroblastoma [BE(2)] (SK-N-SH)	Pentazocine, DTG (+/- dexrallorphan)
Prostate tumor cell line (DU-145) (LnCap)	IPAB, pentazocine, DTG (+/- dexrallorphan)
Mammary adenocarcinoma (line 66)	DTG
Melanoma (A375)	Pentazocine, DTG (+/- dexrallorphan)

L'elevata densità di questi recettori indica il loro coinvolgimento nella fisiopatologia cellulare del cancro e potrebbero avere un potenziale ruolo diagnostico. Queste osservazioni suggeriscono l'uso dei ligandi σ come marcatori radioattivi nelle tecniche diagnostiche non invasive come PET (positron emission tomography) e SPECT (single-proton emission computerized tomography).⁹⁸⁻¹⁰⁰ Un'over-espressione spontanea dei recettori σ_1 nei tumori ipofisari è stata riscontrata dopo una comparazione con i tessuti sani della ghiandola ipofisaria attraverso il ligando σ_1 ^{11}C -SA4503 come tracer. ^{11}C -SA4503 mostra un'elevata affinità verso il sito attivo del recettore σ_1 (K_i 17.4nM), di converso per il recettore σ_2 abbiamo una modesta affinità di legame (1.784nM), esso è comunemente utilizzato per studi PET.¹⁰¹ Il volume di distribuzione totale (V_T) del tracer è molto alto nel tessuto canceroso rispetto ai tessuti ipofisari sani. L'analisi Western Blotting conferma che i recettori σ_1 sono over-espresi nel cellule tumorali ipofisarie.¹⁰¹



¹¹C-SA4503

In letteratura sono presente molti studi che identificano il recettore σ_2 come biomarker per la determinazione del stato proliferativo (PS) nei tumori solidi, usando tecniche PET e SPECT. Wheeler e collaboratori hanno dimostrato che la densità recettoriale dei σ_2 in cellule proliferanti di adenocarcinoma mammario di topo (66P) era circa 10 volte di più rispetto alla densità recettoriale presente nelle quiescenti (66Q).¹⁰² I risultati dello studio condotto da Wheeler sono riportati in **Fig.1.29**, dove si nota che la densità nelle cellule proliferanti dei recettori σ_2 dopo 3 giorni è notevolmente più elevata rispetto alla densità misurata nelle cellule quiescenti dopo 7-10 giorni. Ciononostante i ligandi selettivi σ_2 riescono a regolare la crescita delle cellule tumorali, inoltre sono coinvolti nella regolazione della sopravvivenza, morfologia e differenziazione cellulare.¹⁰³⁻¹⁰⁴

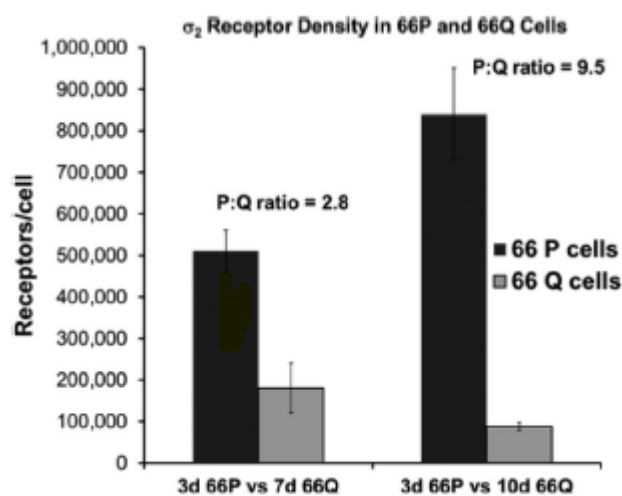
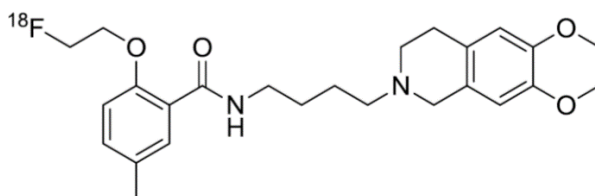


Fig.1.29: Densità del recettore σ_2 in cellule 66P e 66Q.

Infatti gli agonisti selettivi σ_2 inibiscono la proliferazione tumorale, inducendo apoptosi, invece gli antagonisti σ_2 sono in grado di promuovere la sopravvivenza delle cellule tumorali.¹⁰⁵ Siramesine, un potente agente antitumorale *in vivo*, è un agonista selettivo σ_2 che mostra un'affinità sub-nanomolare per il recettore σ_2 con $K_d=0.12$ nM ed è 140 volte più selettivo per il recettore σ_2 rispetto al recettore σ_1 ($K_d=17$ nM).¹⁰⁶

[¹⁸F]-ISO-1, (2-(2-[¹⁸F]fluoroetossi)-N-(4-(3,4-di-idro-6,7-dimetossi-isochinolin-2(1H)-il)butil)-5-metilbenzamide, è un ligando selettivo del recettore σ_2 già in uso durante i test clinici. È stato utilizzato per la determinazione dello stato proliferativo di un tumore e per progettare una strategia selettiva e appropriata, in quanto viene considerato un potenziale ligando per studi di imaging oncologici.¹⁰⁷



[¹⁸F]-ISO-1.

Non solo i ligandi del recettore σ_2 possono indurre processi pro-apototici nelle cellule tumorali ed inibire la crescita tumorale sia *in vitro* che *in vivo*, ma sono in grado di potenziare l'effetto farmacologico di altri agenti antitumorali co-somministrati, come il Paclitaxel e la Gemcitabine, in terapie farmacologiche associative.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹

In conclusione i ligandi selettivi σ possono essere utilizzati per conferire il farmaco in modo sito-specifico alle cellule tumorali, riducendo la tossicità sui tessuti sani.

1.14 Scopo della ricerca

L'obiettivo di questa linea di ricerca è lo sviluppo di ligandi ibridi σ /NO attivati dalla luce per il trattamento di patologie tumorali.

A tal proposito è stata presa in considerazione l'over-espressione dei recettori σ in molti tipi di tumori. Sono state esaminate ben 13 linee di cellule tumorali umane e non umane provenienti da diversi tessuti, per valutare la presenza dei recettori σ_1 e σ_2 attraverso saggi di binding con radioligandi.⁹⁷ I recettori σ_1 presenti sulle membrane delle linee cellulari, riportate in **Tabella 4a-b**, sono stati marcati usando [³H](+)-pentazocina, mentre i recettori σ_2 sono stati marcati con [³H]DTG, in presenza o assenza di Dextrallorphan. I valori di B_{max} e di K_d sono stati estrapolati attraverso l'analisi di Scatchard.

Tabella 4a

Cell line	σ_1 ([³ H](+)-pentazocine)	σ_2 ([³ H]DTG + Dextrallorphan)
MCF-7 breast adenocarcinoma	No specific binding	$K_d = 24.54 \pm 5.57$ $B_{max} = 2071 \pm 734$
T47D breast ductal carcinoma	$K_{d1} = 6.62 \pm 1.03$ $B_{max1} = 108 \pm 64.6$ $K_{d2} = 261 \pm 41.48$ $B_{max2} = 1690 \pm 164$	$K_d = 19.95 \pm 3.53$ $B_{max} = 1221 \pm 264$
NCI H727 lung carcinoid	$K_{d1} = 3.81 \pm 1.80$ $B_{max1} = 25.51 \pm 7.46$ $K_{d2} = 127 \pm 8.15$ $B_{max2} = 2099 \pm 339$	$K_d = 44.44 \pm 1.78$ $B_{max} = 2835 \pm 467$
A375 melanoma	$K_{d1} = 0.67 \pm 0.23$ $B_{max1} = 33.99 \pm 12.77$ $K_{d2} = 129 \pm 12.05$ $B_{max2} = 3223 \pm 33$	$K_d = 34.19 \pm 2.18$ $B_{max} = 3403 \pm 348$
ThP-1 leukemia	$K_d = 146. \pm 52.59$ $B_{max} = 1411 \pm 102$	$K_d = 39.5. \pm 6.72$ $B_{max} = 491 \pm 22$
U-138MG glioblastoma	$K_d = 60.88. \pm 13.21$ $B_{max} = 1115 \pm 244$	$K_d = 80.83. \pm 5.85$ $B_{max} = 3136 \pm 871$
SK-N-SH neuroblastoma	$K_d = 27.99 \pm 5.78$ $B_{max} = 975 \pm 225$	$K_d = 32.35 \pm 3.26$ $B_{max} = 944 \pm 104$
LNCaP PGC prostate	$K_d = 38.44. \pm 17.78$ $B_{max} = 1196 \pm 490$	$K_d = 39.00. \pm 0.40$ $B_{max} = 727 \pm 5.67$

Tabella 4b

Cell line	σ_1 ($[H^3]$ (+)-pentazocine)	σ_2 ($[H^3]$ DTG + Dextrallorphan)
C6 glioma (rat)	$K_d1 = 5.7 \pm 1.3$ $B_{max1} = 42.0 \pm 17.4$ $K_d2 = 287 \pm 65$ $B_{max2} = \pm 33$	$K_d = 101 \pm 7.0$ $B_{max} = 5507 \pm 5.37$
NB4LA3 neuroblastoma (mouse)	$K_d1 = 3.0 \pm 1.4$ $B_{max1} = 76.5 \pm 15.2$ $K_d2 = 327 \pm 92$ $B_{max2} = 54.31 \pm 17$	$K_d = 64.3 \pm 6.4$ $B_{max} = 7324 \pm 670$
N1E-115 neuroblastoma (mouse)	$K_d1 = 3.0 \pm 0.3$ $B_{max1} = 41.5 \pm 22.3$ $K_d2 = 360 \pm 145$ $B_{max2} = 1678 \pm 134$	$K_d = 25.5 \pm 0.4$ $B_{max} = 3344 \pm 301$
NG 108-1,5 mouse neuroblastoma x rat glioma	$K_d1 = 7.0 \pm 1.2$ $B_{max1} = 94.8 \pm 1.6$ $K_d2 = 600 \pm 197$ $B_{max2} = 4553 \pm 1687$	$K_d = 75.0 \pm 0.7$ $B_{max} = 3134 \pm 229$
S-20Y neuroblastoma (mouse)	Not done	$K_d = 46.0 \pm 4.9$ $B_{max} = 2456 \pm 1.35$

Tutte le linee cellulari esaminate esprimono un'elevata densità di recettori σ_2 con valori di K_d per $[^3H]$ DTG che si aggirano da 20 a 10 nM e con valori di B_{max} da 491 a 7324 fmol/mg proteina.

Sulla base di questi dati l'elevata presenza dei recettori σ in queste linee cellulari suggerisce l'importanza del loro ruolo nella patogenesi tumorale.⁹⁷

Quindi, dato il crescente interesse per i ligandi σ come potenziali agenti chemioterapici e sulla base degli studi sul fotorilascio di NO menzionati in precedenza, abbiamo concentrato l'attività di ricerca sulla progettazione e sintesi di ligandi σ (derivati piperidinici e piperazinici *etc.* opportunamente sostituiti) capaci di svolgere un'azione antitumorale attraverso:

- elevata affinità e attività antagonista σ_1 e/o agonista σ_2 ;
- rilascio "light-activated" di NO.

La duplice azione si presume che comporti un incremento sia dell'attività antiproliferativa che un'azione più selettiva verso cellule tumorali *over-esprimenti* i recettori σ rispetto a quelle sane con ridotta espressione di tali recettori (**Fig. 1.30**).

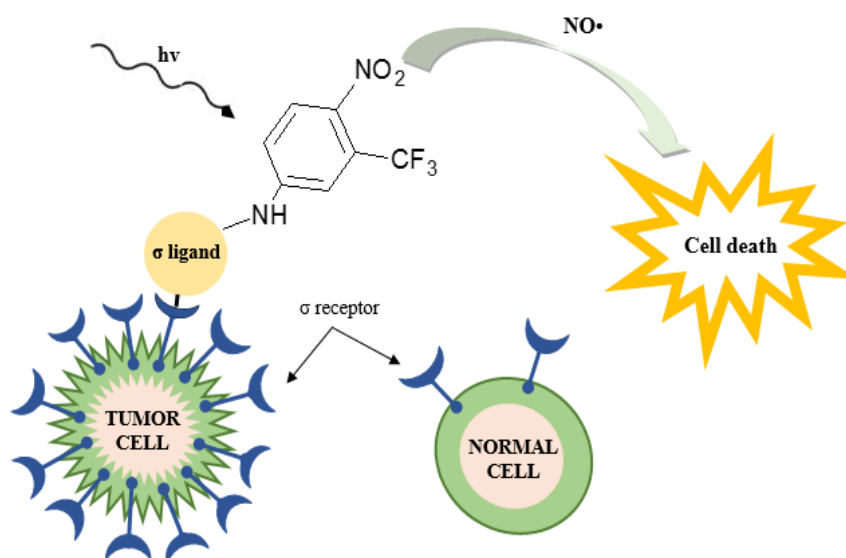
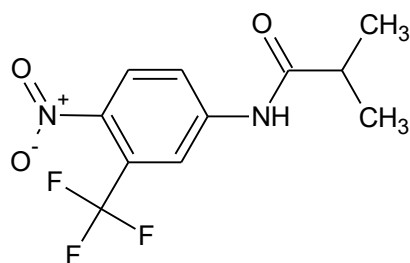


Fig. 1.30: Potenziale attività antiproliferativa di ligandi σ a rilascio foto- controllato di NO.

Come detto in precedenza, possiamo anche considerare, nel caso dei ligandi di natura ammidica, una triplice funzione; ovvero una possibile attività antiandrogenica e quindi un loro possibile impiego nel trattamento del tumore prostatico. Infatti, questi composti mostrano una struttura simile ad uno dei principali antiandrogeni non steroidei, la *Flutamide*. Secondo gli studi SAR effettuati, gli antiandrogeni non steroidei più attivi sono quelli contenenti sostituenti elettron-attrattori sull'anello aromatico ed una catena alchilica ramificata in α al carbonio carbonilico dell'ammide. Inoltre, l'introduzione di un secondo gruppo elettron-attrattore sulla parte aromatica ne ha incrementato ulteriormente la potenza, in particolare il gruppo CF₃ in posizione 2 dell'anilide ha aumentato l'attività antiandrogenica del composto di ben 5 volte.



Flutamide

PARTE SPERIMENTALE

2.1 MATERIALI E METODI

Gli spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR, sono stati registrati su uno spettrometro Varian Inova 500 MHz, e sono stati eseguiti in soluzione deuterata di CDCl_3 contenenti lo 0,03% di TMS (tetrametilsilano). Le purificazioni dei prodotti sono state eseguite mediante flash chromatography, utilizzando colonne in vetro del diametro compreso tra 1 e 4 cm, impaccate con gel di silice Si 60 0.040-0.063 mm 230-400 mesh (Merck). La purezza dei composti sintetizzati è stata verificata tramite cromatografia su strato sottile (TLC), su foglio di alluminio al gel di silice 60 F254 (Merck). I punti di fusione dei composti sintetizzati sono stati determinati mediante apparecchio BUCHI 530 utilizzando un tubo capillare aperto.

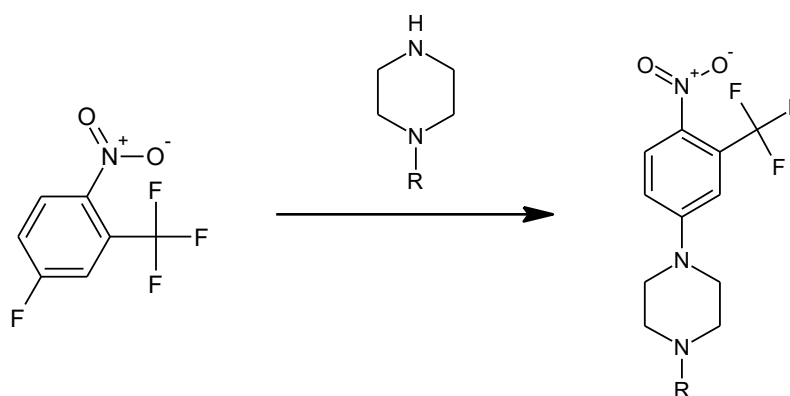
2.2 DISCUSSIONE CHIMICA

I composti progettati e sintetizzati sono:

- **MRAC3** 1-benzil-4-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperazina;
- **MRAC4** 1-benzil-*N*-metil-*N*-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperidin-4-amina;
- **MRAC5** 1-(4-metossibenzil)-4-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperazina;
- **MRAC6** 1-benzil-*N*-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperidin-4-amina;
- **MRCB3** 1-cicloesil-4-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperazina;
- **MRCB5** 1-(cicloesilmetil)-4-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperazina

Il percorso sintetico prevede un unico step. Si tratta di una reazione di sostituzione nucleofila aromatica tra 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzene e ammine alifatiche, primarie e secondarie, variamente sostituite in presenza di CH₃CN a 80°C, condotta in fiala chiusa. (**SCHEMA1**, **SCHEMA2**)

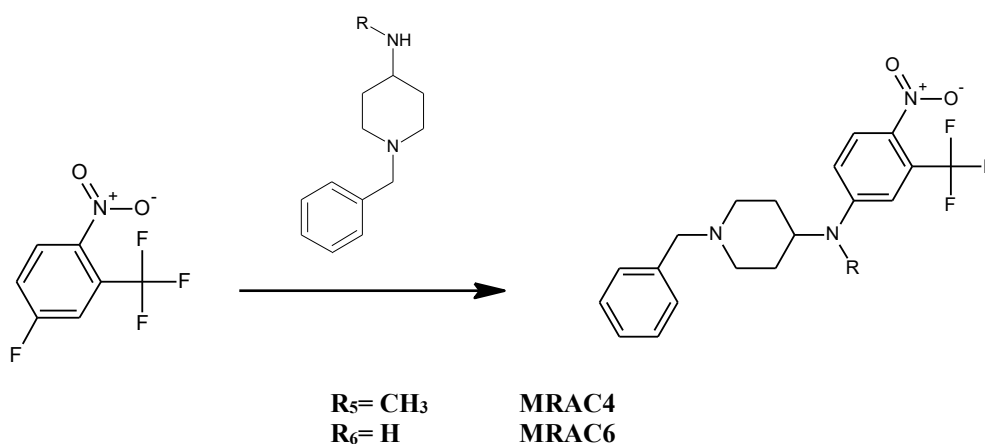
SCHEMA 1



R₁ = CH ₂ -Ph	MRAC3
R₂ = CH ₂ -Ph-4-OCH ₃	MRAC5
R₃ = CICLOESILE	MRCB3
R₄ = METIL-CICLOESILE	MRCB5

Schema 1. Reagenti e condizioni: Acetonirile, 80°C, overnight.

SCHEMA 2



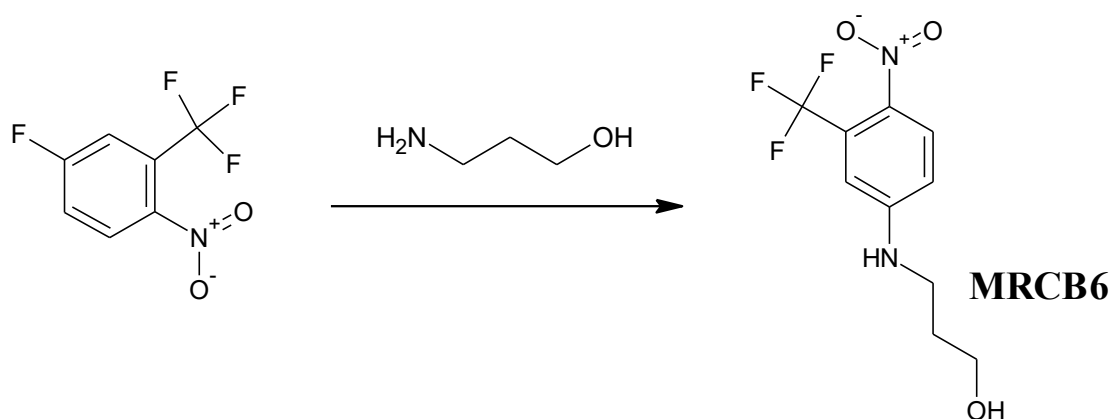
Schema 2. Reagenti e condizioni: Acetonirile, 80°C, overnight.

I percorsi sintetici per l'ottenimento dei composti:

- **MRCB6** 3-{[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]amino}propan-1-olo
- **MRCB7** 3-{[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]amino}propil metansolfonato

si effettuano in due step. La prima reazione è una sostituzione nucleofila aromatica condotta tra 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzene e 3-aminopropan-1-olo in presenza di CH₃CN anidro a 60°C condotta overnight in fiala chiusa, per l'ottenimento di **MRCB6**. (**SCHEMA 3**)

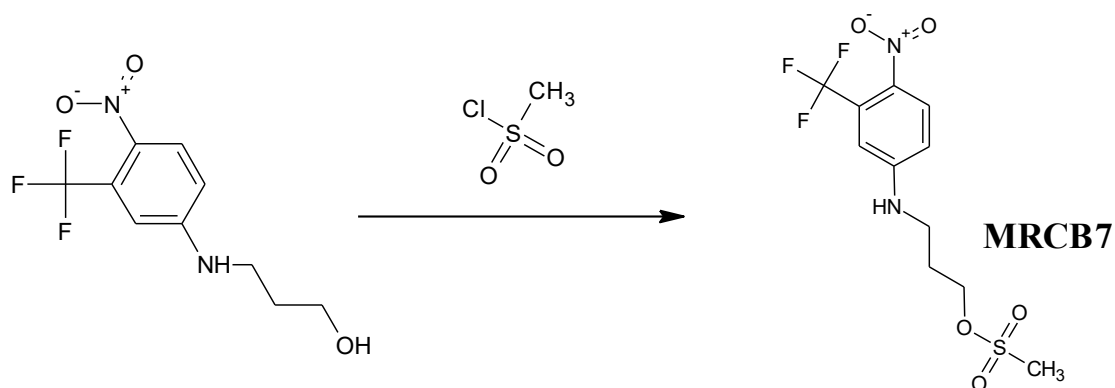
SCHEMA 3



Schema 3. Reagenti e condizioni: CH₃CN 60°C overnight

La seconda reazione consiste nella reazione tra 3-{[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]amino}propan-1-olo (**MRCB6**), e il metil-solfonilcloruro in presenza di TEA, in CH₂Cl₂ anidro a 0°C (**SCHEMA4**)

SCHEMA 4



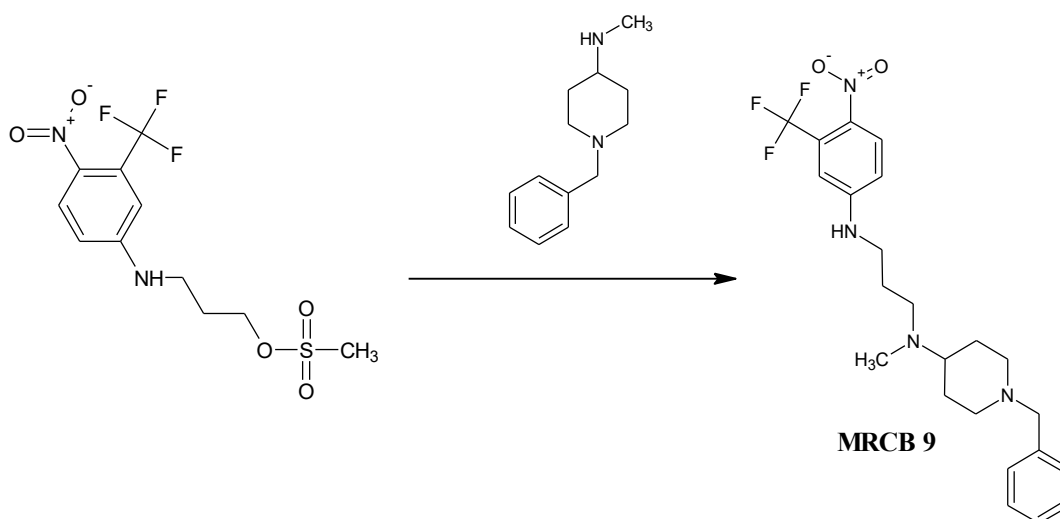
Schema 4 Reagenti e condizioni: TEA, CH₂Cl₂ a 0°C e poi a temperatura ambiente per 2 ore

Il derivato metansolfonato **MRCB7**, è stato utilizzato come intermedio per l'ottenimento di:

- **MRCB8** 4-(4-clorofenil)-1-(3-((4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)ammino)propil)piperidin-4-olo
- **MRCB9** N-(1-benzilpiperidin-4-il)-N-metil-N-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)propan-1,3-diammina
- **MRCB10** N-(3-(4-benzilpiperazin-1-il)propil)-4-nitro-3-(trifluorometil)anilina
- **MRCB11** N-(3-(4-cicloesilpiperazin-1-il)propil)-4-nitro-3-(trifluorometil)anilina

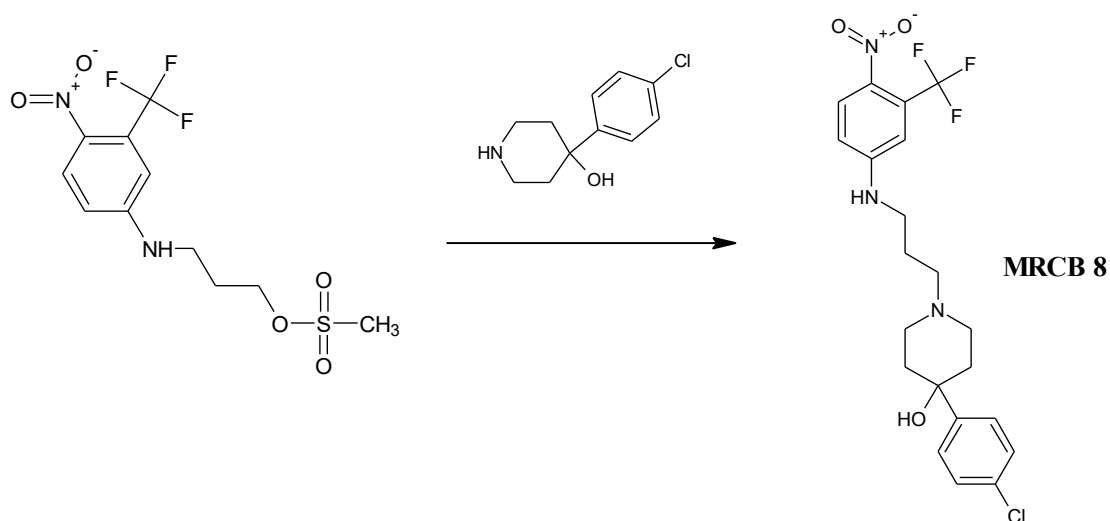
La reazione di sostituzione è stata condotta tra 3-{{[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]amino}propil} metansolfonato e piperidine o piperazine variamente funzionalizzate, in presenza di CH₃CN a 60°C per 24 ore. (**SCHEMA 5**, **SCHEMA 6**, **SCHEMA 7**)

SCHEMA 5



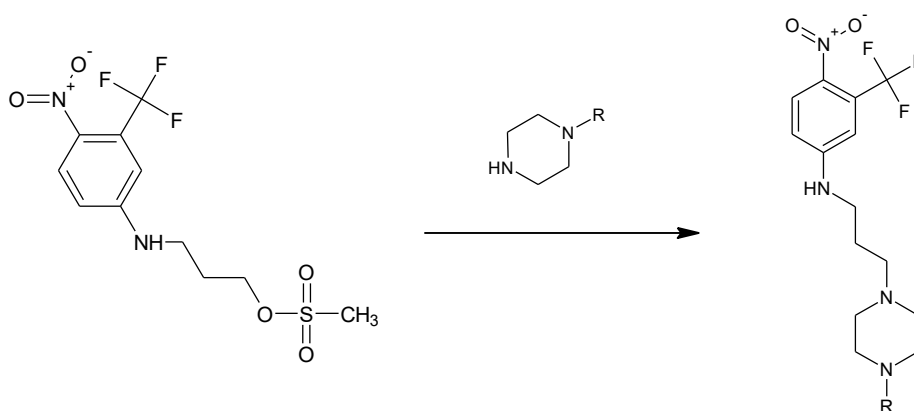
Schema 5 Reagenti e condizioni: CH₃CN a 60°C per 24 ore

SCHEMA 6



Schema 6 Reagenti e condizioni: CH₃CN a 60°C per 24 ore

SCHEMA 7



MRCB 10 **R= CH₂Ph**

MRCB 11 **R₂= C₆H₁₁**

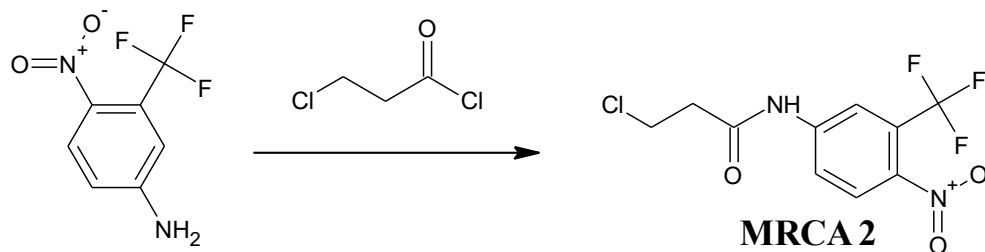
Schema 7 Reagenti e condizioni: CH₃CN a 60°C per 24 ore

Inoltre sono stati sintetizzati i seguenti composti:

- **MRAC 2** 3-cloro-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]propanamide
- **MRCB 2** 3-(4-(4-clorofenil)-4-idrossipiperidin-1-il)-N-(4-nitro-3-trifluorometil)fenil)propanamide
- **MRCB1** 3-((1-benzilpiperidin-4-il)(metil)ammino)-N-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)propanamide
- **MRCB 4** 3-(4-benzilpiperazin-1-il)-N-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)propanamide
- **MRAC 7** 3-(4-cicloesilpiperazin-1-il)-N-(4-nitro-3(trifluorometil)fenil)propanamide

L'intermedio **MRCA2** è stato ottenuto tramite una reazione di ammidazione tra 4-nitro-3-(trifluorometil)anilina e 3-cloropropanoil cloruro in THF e TEA a 0° (**SCHEMA 8**).

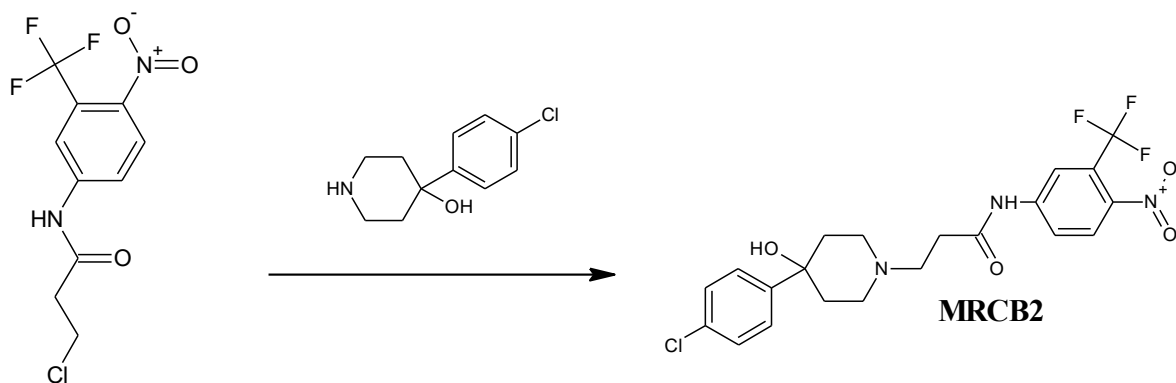
SCHEMA 8



Schema 8 Reagenti e condizioni: THF, TEA, 0°C, 24 ore

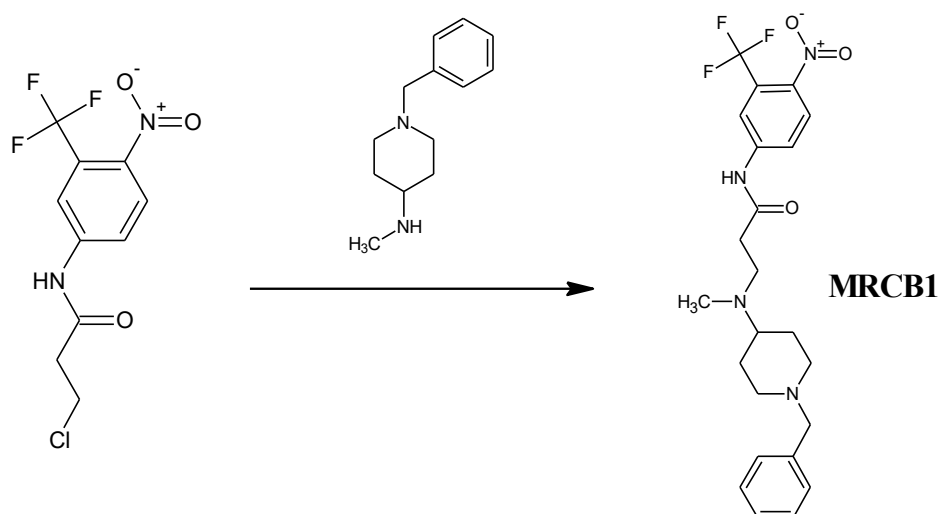
I composti **MRCB 1**, **MRCB 2**, **MRCB 4**, **MRAC 7** sono stati ottenuti tramite reazione di sostituzione nucleofila tra 3-cloro-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]propanamide e piperidine e piperazine opportunamente sostituite in MEK, KHCO_3 a 70°C overnight. (**SCHEMA 9**, **SCHEMA 10**, **SCHEMA 11**)

SCHEMA 9



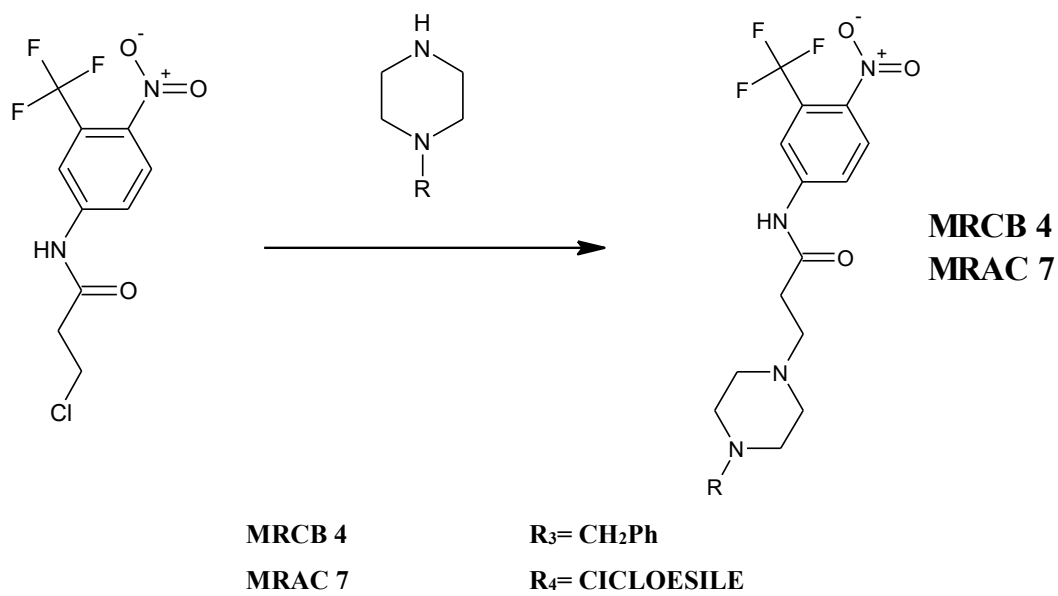
Schema 9 Reagenti e condizioni: MEK, KHCO_3 a 70°C, overnight

SCHEMA 10



Schema 10 Reagenti e condizioni: MEK, KHCO₃ a 70°C, overnight

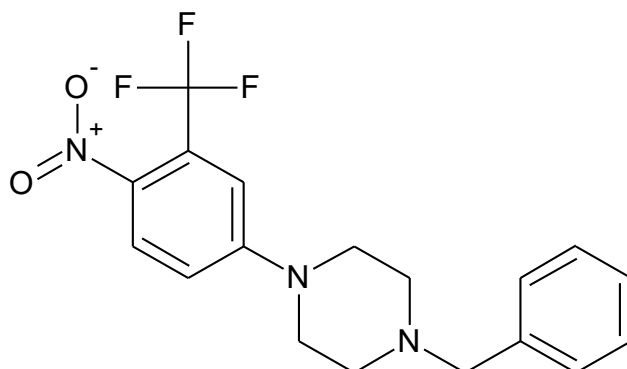
SCHEMA 11



SCHEMA 11 Reagenti e condizioni: MEK, KHCO₃ a 70°C, overnight

2.3 Sezione Sperimentale

1-benzil-4-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperazina



MRAC3

Ad una soluzione di 1-benzilpiperazina (0.337 g, 1,91 mmol) e CH₃CN anidro (4 ml), viene aggiunto goccia a goccia il 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzene (0.2 g 0,96 mmol). Immediatamente si osserva un viraggio cromatico verso il giallo intenso. La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica in fiala chiusa a 80°C tutta la notte.

La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Si ottiene un prodotto giallo (0.405 g, resa 100%). Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto (**p.f. 232-233 °C**).

C₁₈H₁₈F₃N₃O₂ • HCl PM=401.81

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	54.00	53.80	0.20
H%	4.97	4.77	0.20
N%	10.56	10.46	0.10

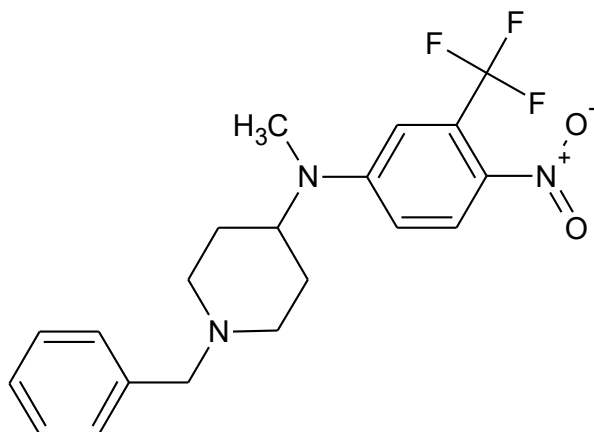
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 2.60 (t, 4H *J*=5.0 Hz), 3.40 (t, 4H, *J*=5.5 Hz), 3.6 (s, 2H), 6.85-8.10 (m, 8H)

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 46.95, 52.73, 62.75, 112.00, 114.55, 121.21, 123.38, 126.00, 127.35, 128.31, 129.79, 136.86, 137.39, 153.27.

1-benzil-N-metil-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperidin-4-amina



MRAC4

Ad una soluzione della 1-benzil-N-metilpiperidin-4-amina (0.391 g, 1,91 mmol) e CH₃CN anidro (4 ml), viene aggiunto goccia a goccia il 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzene (0.2 g 0,96 mmol). Immediatamente si osserva un viraggio cromatico verso il giallo intenso. La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica in fiala chiusa a 80°C tutta la notte.

La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Si ottiene un prodotto giallo (0.376 g, resa 100%). Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto (p.f. 240-241 °C).

C₂₀H₂₂F₃N₃O₂ • HCl PM=429.86

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	56.00	55.88	0.12
H%	5.54	5.39	0.15
N%	10.00	9.78	0.22

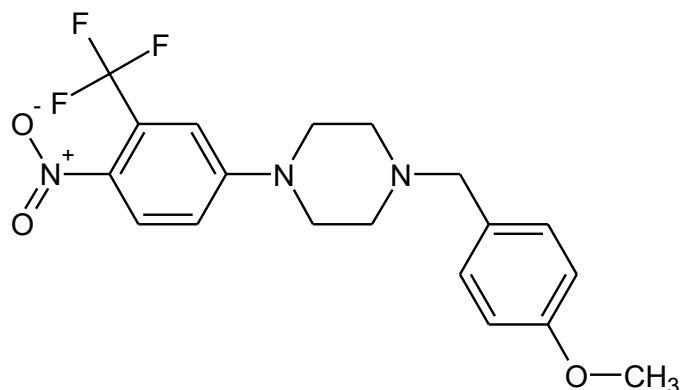
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.62-1.74 (m, 2H), 1.83-1.95 (m, 2H), 2.11-2.15 (m, 2H), 2.87 (s, 3H), 3.00-3.05 (m, 2H), 3.58(s, 2H), 3.55-3.73 (m,1H), 6.76-8.10 (m, 8H).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 29.11, 31.62, 52.83, 56.64, 62.89, 110.1, 112.50, 121.36, 123.54, 127.17, 128.27, 128.93, 129.08, 135.31, 138.00, 152.47.

1-(4-metossibenzil)-4-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperazina



MRAC5

Ad una soluzione della 1-(4-metossibenzil)piperazina (0.395 g, 1.91 mmol) e CH₃CN anidro (4 ml), viene aggiunto goccia a goccia il 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzene (0.2 g 0,96 mmol). Immediatamente si osserva un viraggio cromatico verso il giallo intenso.

La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica in fiala chiusa a 80°C tutta la notte. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Si ottiene un prodotto giallo (0.425 g, resa 100%). Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto (p.f. 165-166 °C).

C₁₉H₂₀F₃N₃O₂ • HCl PM=431.84

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	52.90	52.84	0.06
H%	5.10	4.90	0.20
N%	9.93	9.73	0.20

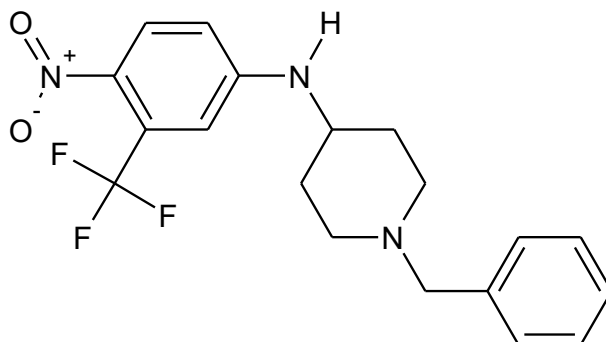
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 2.58 (t, 4H *J*=5.0 Hz), 3.40 (t, 4H, *J*=5.0 Hz), 3.10 (s, 2H), 3.81(s, 3H), 6.86 a 8.01 (m, 7H).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 46.95, 52.14, 55.21, 62.11, 111.93, 113.70, 114.52, 121.22, 123.40, 128.54, 129.36, 130.25, 136.83, 153.26, 158.91.

1-benzil-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperidin-4-amina



MRAC6

Ad una soluzione della 1-benzilpiperidin-4-amina (0.364 g, 1.91 mmol) e CH₃CN anidro (4 ml), viene aggiunto goccia a goccia il 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzene (0.2 g 0,96 mmol). Immediatamente si osserva un viraggio cromatico verso il giallo intenso.

La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica in fiala chiusa a 80°C tutta la notte. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Si ottiene un prodotto giallo (0.373 g, resa 100%). Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto (p.f. 227-228 °C).

C₁₉H₂₀F₃N₃O₂ • HCl PM=415.84

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	55.15	54.88	0.27
H%	5.31	5.09	0.22
N%	10.28	10.10	0.18

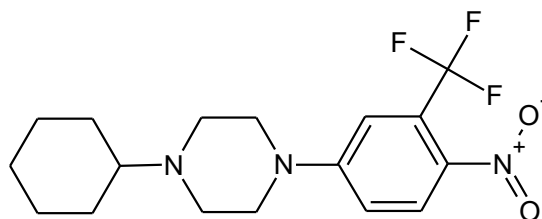
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.42-1.56 (m, 2H), 1.93-1.95 (m, 2H), 2.09-1.6(m, 2H), 2.76-2.80 (m, 2H), 3.20-3.60 (m, 1H), 3.35 (s, 2H), 4.95 (d, 1H, *J*=7.0 Hz), 6.50-8.10 (m, 8H).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 31.87, 49.95, 51.79, 62.94, 111.46, 112.55, 118.96, 121.13, 126.88, 128.26, 129.07, 129.24, 136.25, 137.97, 150.75.

1-cicloesil-4-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperazina



MRCB3

Ad una soluzione della 1-cicloesilpiperazina (0.322 g, 1,91 mmol) e CH₃CN anidro (4 ml), viene aggiunto goccia a goccia il 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzene (0.2 g 0,96 mmol). Immediatamente si osserva un viraggio cromatico verso il giallo intenso.

La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica in fiala chiusa a 80°C tutta la notte. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Si ottiene un prodotto giallo (0.390 g, resa 100%). Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto (p.f. 130-131 °C).

C₁₇H₂₂F₃N₃O₂ • HCl PM=393.83

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	51.89	51.84	0.05
H%	6.00	5.89	0.11
N%	10.76	10.67	0.09

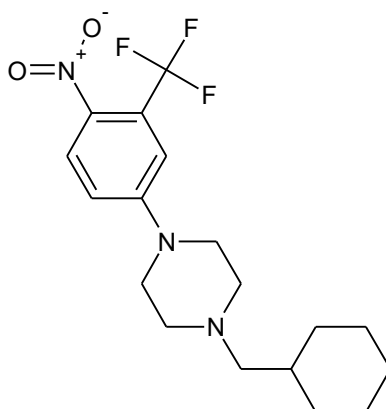
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.08-1.31 (m, 5H), 1.61-1.86 (m, 5H), 2.28-2.38 (m, 1H), 2.72 (t, 4H, *J*=5.5 Hz), 3.43 (t, 4H, *J*=5.0 Hz), 6.91 (dd, 1H, *J*=3.0, *J*=9.5 Hz), 7.13(d, 1H, *J*=2.5 Hz), 8.02(d, 1H, *J*=9.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 25.71, 26.17, 28.87, 47.40, 48.39, 63.38, 111.94, 114.40, 121.24, 123.42, 128.62, 136.78, 153.28.

1-(cicloesilmetil)-4-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]piperazina



MRCB5

Ad una soluzione della 1-(cicloesilmetil)piperazina (0.349 g, 1.91 mmol) e CH₃CN anidro (4 ml), viene aggiunto goccia a goccia il 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzene (0.2 g, 0.96 mmol). Immediatamente si osserva un viraggio cromatico verso il giallo intenso.

La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica in fiala chiusa a 80°C tutta la notte. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH.

Si ottiene un prodotto giallo (0.348 g, resa 98%). Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto (p.f. 188-189 °C)

C₁₈H₂₄F₃N₃O₂ • HCl PM=407.86

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	53.21	53.01	0.20
H%	6.51	6.18	0.33
N%	10.31	10.30	0.01

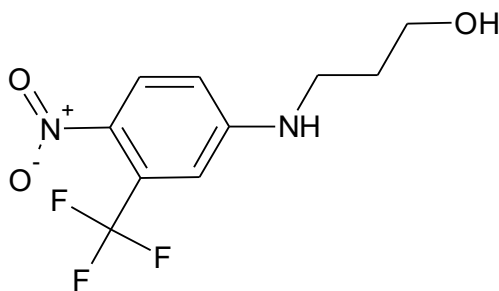
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 0.85-0.94 (m, 2H), 1.13-1.29 (m, 3H), 1.46-1.1.56 (m, 1H), 1.64-1.80 (m, 5H), 2.18 (d, 2H, *J*=7.5 Hz), 2.54 (t, 4H, *J*=5.0 Hz), 3.42 (t, 4H, *J*=5.5 Hz), 6.90 (dd, 1H, *J*=3.0, *J*=9.5 Hz), 7.13(d, 1H, *J*=3.0 Hz), 8.01(d, 1H, *J*=9.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 26.06, 26.73, 31.77, 35.02, 47.00, 52.91, 65.34, 111.92, 114.47, 121.26, 123.43, 128.58, 136.86, 153.34.

3-{{4-nitro-3-(trifluorometil)fenil}amino}propan-1-olo



MRCB 6

Ad una soluzione di 3-aminopropan-1-olo (0.143g 1.90 mmol) e CH₃CN anidro (5ml) viene aggiunto goccia a goccia il 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benzene (0.200g 0.95 mmol). La reazione viene posta sotto agitazione magnetica a 60°C per 12 ore in fiala chiusa. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo ottenuto è stato trattato con *n*-esano fino all'ottenimento di un precipitato giallo che viene ripetutamente decantato e lavato. Il precipitato giallo è stato risolubilizzato in etile acetato e lavato 3 volte con 25 ml di soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su NaSO₄ e concentrata a pressione ridotta. Il prodotto isolato (265mg; resa del 100%) è stato subito utilizzato per lo step successivo, senza necessità di ulteriore purificazione.

C₁₀H₁₁F₃N₂O₃ PM=264.21

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	45.46%	45.42%	0.04
H%	4.20%	4.16%	0.04
N%	10.60%	10.60%	0

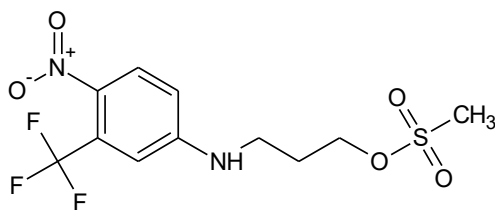
¹H NMR (Acetone d₆) base libera

δ (ppm) 1.85 (qui, 2H *J*=6.5 Hz); 3.40 (q, 2H *J*=6.5 Hz); 3.68-3.82 (m, 3H); 6.67 (br s, 1H); 6.88 (dd, 1H *J*=3.0 Hz, *J*=6.5 Hz); 7.09 (d, 1H *J*=3.0 Hz); 8.03 (d, 1H, *J*=8.5 Hz).

¹³C NMR (Acetone d₆) base libera

δ (ppm) 29.45; 40.975; 60.01; 112.00 (d, *J*=145.5 Hz); 123.68 (d, *J*=270.75 Hz); 126.74 (q, *J*=38.25 Hz); 130.26; 136.02; 154.19

3-{{4-nitro-3-(trifluorometil)fenil}amino}propil metansolfonato



MRCB 7

Ad una soluzione di 3-{{4-nitro-3-(trifluorometil)fenil}amino}propan-1-olo (**MRCB 6**) (300mg 1.13mmol) in CH₂Cl₂ anidro (10ml) a 0 °C viene aggiunta TEA (345mg 3.40mmol). La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica per 30'. Successivamente, con un imbuto caricatore, viene fatto gocciolare il metil-solfonilcloruro (328mg, 2.26mmol) e portata a temperatura ambiente per 1 ore. La reazione viene monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/EtilAcetato/CH₃OH 9:0.5:0.5.

La miscela di reazione è stata concentrata a pressione ridotta e il residuo viene solubilizzato in CH₂Cl₂ e ripetutamente lavato con 25 ml di soluzione di NH₄Cl, e con 25ml di soluzione satura di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su NaSO₄ e concentrata a pressione ridotta. Non è stata necessaria ulteriore purificazione con colonna cromatografica, il prodotto è stato isolato (418mg) con una resa del 98.82%. L'intermedio MRCB 7 è stato immediatamente utilizzato per la sintesi dei prodotti finali MRCB 8, MRCB 9, MRCB 10 ed MRCB 11.

C₁₁H₁₃F₃N₂O₅S PM=342.29

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	38.60%	38.56%	0.04
H%	3.83%	3.80%	0.03
N%	8.18%	8.18%	0

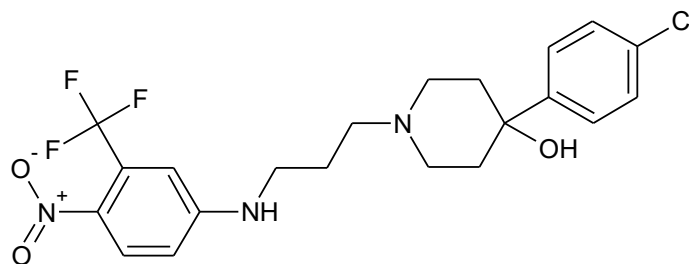
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 2.09 (qui, 2H, *J*=6.5 Hz); 3.06 (s, 3H); 3.44 (t, 2H, *J*=7.0 Hz); 4.36 (t, 2H, *J*=6.0 Hz); 6.67 (dd, 1H, *J*=3.0 Hz, *J*=9.5 Hz); 6.89 (d, 1H, *J*=2.5Hz); 7.99(d, 1H, *J*=9.5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 28.25; 37.54; 39.39; 66.86; 111.15; 111.30; 122.10 (q, *J*=17,12 Hz); 123.27 (q, *J*=271.62 Hz); 126.15 (q, *J*=33.12 Hz); 136.77; 151.41.

4-(4-clorofenil)-1-(3-((4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)ammino)propil)piperidin-4-olo



MRCB 8

Ad una soluzione di 3-{{4-nitro-3-(trifluorometil)fenil}amino}propil metansolfonato (**MRCB 7**) (400mg 1.11 mmol) in CH₃CN anidro (10 ml) viene aggiunto goccia a goccia 4-(4-clorofenil)piperidin-4-olo (455mg 2.15mmol). La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica a 60°C per 24 ore e monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/EtilAcetato/CH₃OH 9:0.5:0.5.

La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Si ottiene un prodotto giallo (464mg) resa 94%.

Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 175,8-176 °C).

C₂₁H₂₃Cl F₃N₃O₃ HCl PM=494.33

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	51.02%	51%	0.02
H%	4.89%	4.85%	0.04
N%	8.50%	8.50%	0

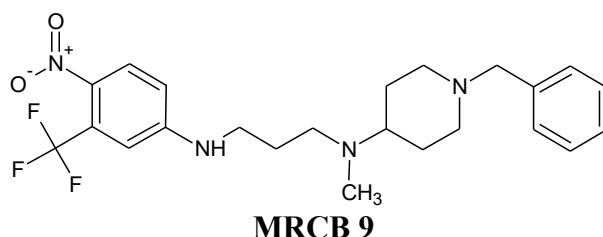
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.80-1.84 (m, 2H,); 1.89 (qui, 2H, *J*=6.5 Hz); 2.09-2.16 (m, 2H); 2.53 (m, 2H); 2.64 (t, 2H, *J*=5,5 Hz); 2.90 (m, 2H); 3.33 (q, 2H, *J*=6.0 Hz); 6.56 (dd, 1H, *J*=3.0 Hz, *J*=9.0 Hz); 6.82 (d, 2H, *J*=3.0 Hz); 7.40 (m, 2H); 8.00 (d,1H, *J*= 9 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 24.43; 38.51; 43.40; 49.44; 57.19; 70.81; 111.03 (d, *J*=97,62 Hz); 122.24 (q, *J*=271,22 Hz); 125.95; 126.54 (q, *J*=33,00 Hz); 128.56; 129.42; 133.06; 135.67; 146.37; 152.33.

N-(1-benzilpiperidin-4-il)-N-metil-N-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)propan-1,3-diammina



Ad una soluzione di 3-{[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]amino}propil metansolfonato (**MRCB 7**) (400mg 1.11 mmol) in CH₃CN anidro (10 ml) viene aggiunto goccia a goccia 1-benzil-N-metilpiperidin-4-amina (459mg 2.25mmol). La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica a 60°C per 24 ore e monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/EtilAcetato/CH₃OH 9:0.5:0.5.

La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Si ottiene un prodotto giallo (262 mg) resa 51%.

Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 136-136,2 °C).

C₂₃H₂₉F₃N₄O₂ HCl PM=486.95

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	56.73%	56.68%	0.05
H%	6.21%	6.16%	0.05
N%	11.51%	11.50%	0.01

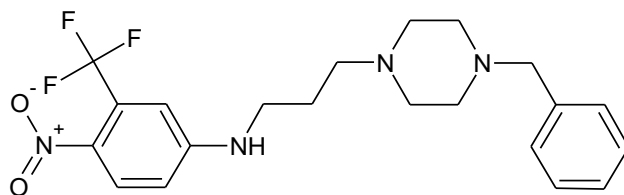
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.59-1.67 (m, 4H); 1.79 (qui, 2H, *J*=6.5 Hz); 1.83-2.00 (m, 2H); 2.31 (s, 3H); 2.43-2.49 (m, 1H); 2.65 (t, 2H, *J*=6.0 Hz); 2.94-2.98 (m, 2H); 3.26 (q, 2H, *J*=5.5 Hz); 3.49 (s, 2H); 6.53 (dd, 1H, *J*=2.5 Hz, *J*=9.5 Hz); 6.78 (d, 1H, *J*=2.5 Hz); 7.05 (br s, 1H); 7.28-7.32 (m, 4H); 7.97 (d, 1H, *J*=9.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 14.06; 20.91; 24.66; 27.38; 37.01; 43.65; 52.94; 60.28; 61.57; 62.81; 111.90; 121.22 (d, *J*=171.50 Hz) 124.39 (q, *J*=271.50 Hz); 126.96 (q, *J*=34.62 Hz); 128.09; 128.26; 128.92; 129.03; 135.30; 138.00; 152.38; 171.06.

N-(3-(4-benzilpiperazin-1-il)propil)-4-nitro-3-(trifluorometil)anilina



MRCB 10

Ad una soluzione di 3-[[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]amino}propil metansolfonato (**MRCB 7**) (400mg 1.11 mmol) in CH₃CN anidro (10 ml) viene aggiunto goccia a goccia 1-benzilpiperazina (421mg 2.38mmol). La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica a 60°C per 24 ore e monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/EtilAcetato/CH₃OH 9:0.5:0.5.

La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Si ottiene un prodotto giallo (374mg) resa 70%. Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 168,5-168,7 °C).

C₂₁H₂₅F₃N₄O₂ HCl PM=458.90

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	54.96%	54.91%	0.05
H%	5.71%	5.70%	0.01
N%	12.21%	12.20%	0.01

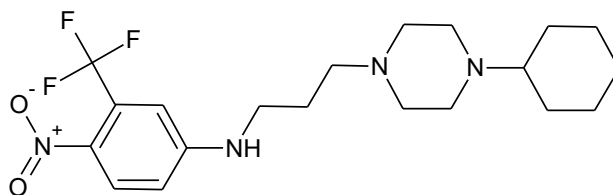
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.79 (qui, 2H, *J*=6.0 Hz); 2.31-2.80 (m, 9H,); 3.27 (q, 2H, *J*=5,5 Hz); 3.55 (s, 2H); 6.53 (dd, 1H, *J*=2.5 Hz, *J*=8.5 Hz); 6.80 (d, 1H, *J*= 2.0 Hz); 7.09 (br, s, 1H); 7.25-7.38 (m, 4H); 7.99 (d, 1H, *J*=9,5 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 23.91; 43.92; 53.15; 53.32; 57.51; 62.99; 110.71; 112.00 (d, *J*=161.50 Hz) 122.39 (q, *J*=271.62 Hz); 126.97 (q, *J*=32.62 Hz); 127.13; 128.23; 129.15; 129.29; 135.57; 137.75; 152.44.

N-(3-(4-cicloesilpiperazin-1-il)propil)-4-nitro-3-(trifluorometil)anilina



MRCB 11

Ad una soluzione di 3-{[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]amino}propil metansolfonato (**MRCB 7**) (400mg 1.11 mmol) in CH₃CN anidro (10 ml) viene aggiunto goccia a goccia 1-cicloesilpiperazina (355mg 2.11mmol). La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica a 60°C per 24 ore e monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/EtilAcetato/CH₃OH 9:0.5:0.5.

La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo è stato ripreso in CH₂Cl₂ e direttamente purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Si ottiene un prodotto giallo (333 mg) resa 76%. Il prodotto è stato opportunamente trasformato in cloridrato per aggiunta di etanolo cloridrico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto.

C₂₀H₂₉F₃N₄O₂ HCl PM=450.92

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	53.27%	53.22%	0.05
H%	6.71%	6.65%	0.06
N%	12.42%	12.42%	0

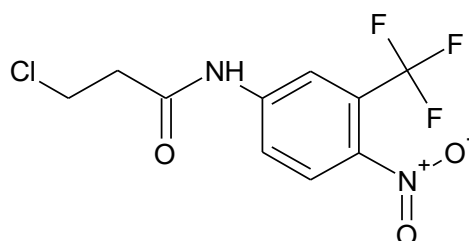
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.09-1.31 (m, 6H); 1.63-1.66 (m, 1H); 1.76-1.94 (m, 6H); 2.30 (m, 1H); 2.40-2.80 (m, 10H); 3.30 (q, 2H, *J*=5,5 Hz); 6.55 (dd, 1H, *J*=2,5 Hz, *J*=9,0 Hz); 6.82 (d, 1H, *J*=2,5 Hz); 7.17 (br s, 1H); 7.99 (d, 1H, *J*=9.0 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 23.88; 25.63; 26.08; 28.62; 43.52; 48.99; 53.29; 57.16; 63.36; 110.78 (d, *J*=107.00 Hz) 122.40 (q, *J*=271.62 Hz); 126.30 (q, *J*=32.75 Hz) 129,26; 135,10; 152,46.

3-cloro-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]propanamide



MRAC 2

Ad una soluzione di 4-nitro-3-(trifluorometil) anilina (500mg 2.42mmol) in THF anidro (10ml) a 0°C viene aggiunto TEA (0.337ml 2.42mmol) e successivamente, goccia a goccia, il 3-cloropropanoil cloruro (0.347ml 3.64mmol). Terminata l'aggiunta la reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24 ore. La reazione è stata monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/EtilAcetato 9.5:0.5.

Alla miscela di reazione vengono aggiunti 20 ml di acqua deionizzata e si lascia agitare per un'ora. Successivamente la miscela è ripresa con etile acetato e posta in un imbuto separatore. Si lava ripetutamente la fase organica con una soluzione al 4% di NaHCO₃.

La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ e concentrata a pressione ridotta. Il prodotto (668.4mg resa 93.2%) non necessita di ulteriore purificazione ed ha una consistenza cristallina.

MRAC 2 è stato utilizzato come intermedio di reazione per l'ottenimento dei composti finali **MRCB 1**, **MRCB 2**, **MRCB 4**, **MRAC 7**.

C₁₀H₈ClF₃N₂O₃ PM=296.63

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	40.49%	40.45%	0.04
H%	2.72%	2.70%	0.02
N%	9.44%	9.44%	0-

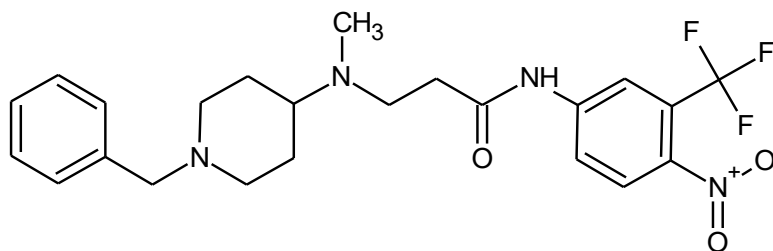
¹H NMR (DMSO) base libera

δ (ppm) 2.89(t, 2H *J*=6.5Hz); 3.87 (t, 2H *J*=6.5Hz); 8.00-8.41 (m, 3H *J*= 2 Hz); 10.87 (s,1H).

¹³C NMR (DMSO) base libera

δ (ppm) 38.9; 40.8; 117,15 (q, *J*=6.00 Hz) ; 120.88 (q, *J*=166.75 Hz); 122,22; 122.80 (q, *J*=36.25 Hz); 127,77; 141,38; 143,41; 169.38.

3-((1-benzilpiperidin-4-il)(metil)ammino)-N-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)propanamide



MRCB 1

Ad una soluzione di 3-cloro-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]propanamide (**MRAC 2**) (200mg 0.67mmol) in MEK (15ml) vengono aggiunti KHCO_3 (101mg 1.008mmol) e 1-benzil-N-metilpiperidin-4-amina (138mg 0.67mmol) sotto agitazione magnetica e a 70°C per 16 ore. La reazione è stata monitorata con TLC con eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7:3. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta, il residuo è stato ripreso con etile acetato e lavata ripetutamente con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 e concentrata a pressione ridotta. Il crudo di reazione è purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$. Si ottiene un prodotto giallo (270mg) resa 86.69%. Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. $124,7\text{-}125^\circ\text{C}$).

$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3$ OSSALATO PM=554.51

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	54.15%	54.10%	0.05
H%	5.27%	5.23%	0.04
N%	10.10%	10.10%	0-

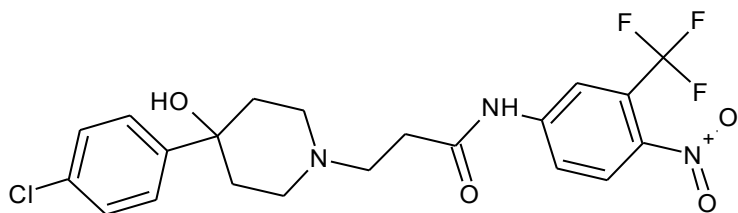
^1H NMR (CDCl_3) base libera

δ (ppm) 1.70-1.75 (m, 4H); 1.98-2.04 (m, 2H); 2.39 (s, 3H); 2.54 (t, 2H $J=5.5$ Hz); 2.60-2.63 (m, 1H); 2.84 (t, 2H, $J=6.0$ Hz); 2.99-3.02 (m, 2H); 3.55 (s, 2H); 7.24 (m, 5H $J=2$ Hz); 7.85 (m, 3H $J=2.5$ Hz); 12.05 (s, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3) base libera

δ (ppm) 27.44; 32.76; 35.54; 49.48; 52.82; 61.24; 62.80; 117.87 (t, $J=5.75$ Hz); 121.73 (q, $J=272.25$ Hz) 121.75 (q, $J=34.12$ Hz); 125.16; 128.20; 137.91; 143.07; 171.53.

3-(4-(4-clorofenil)-4-idrossipiperidin-1-il)-N-(4-nitro-3-trifluorometil)fenil)propanamide



MRCB 2

Ad una soluzione di 3-cloro-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]propanamide (**MRAC 2**) (200mg 0.67mmol) in MEK (15ml) vengono aggiunti KHCO_3 (101mg 1.008mmol) e 4-(4-clorofenil)piperidin-4-olo (142mg 0.67mmol) sotto agitazione magnetica e a 70°C per 16 ore. La reazione è stata monitorata con TLC con eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7:3. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta, il residuo è stato ripreso in etilacetato e lavata ripetutamente con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 e concentrata a pressione ridotta. Il crudo di reazione è purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$. Si ottiene un prodotto giallo (319mg) resa 100%. Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. **125,8-126 °C**).

C₂₁H₂₁ClF₃N₃O₄ OSSALATO PM=561.89

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	49.16%	49.12%	0.04
H%	4.13%	4.09%	0.04
N%	7.48%	7.47%	0.01

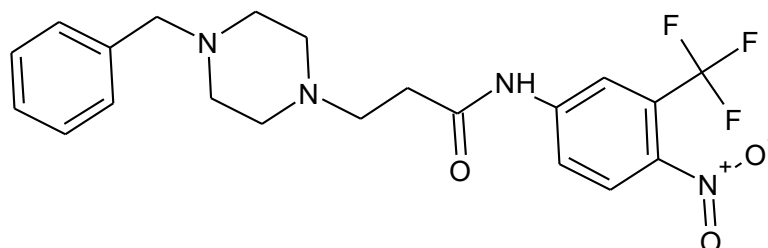
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.93-1.97 (m, 2H); 2.09-2.16 (m, 2H); 2.40-3.20 (m, 10H); 7.29-8.20 (m, 7H); 12.17 (br s, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 32.43; 38.49; 48.51; 53.25; 75.51; 117.55 (q, $J=5.75$ Hz); 121.70; 122.89 (q, $J=272.12$ Hz); 125.11 (q, $J=33.87$ Hz); 125.82; 127.22; 128.80; 133.39; 143.15; 145.88; 171.29.

3-(4-benzilpiperazin-1-il)-N-(4-nitro-3-(trifluorometil)fenil)propanamide



MRCB 4

Ad una soluzione di 3-cloro-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]propanamide (200mg 0.67mmol) in MEK (15ml) vengono aggiunti KHCO_3 (101mg 1.008mmol) e 1-benzilpiperazina (118mg 0.67mmol) sotto agitazione magnetica e a 70°C per 16 ore. La reazione è stata monitorata con TLC con eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7:3. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta, il residuo è stato ripreso in etilacetato e lavata ripetutamente con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 e concentrata a pressione ridotta. Il crudo di reazione è purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$. Si ottiene un prodotto bianco cristallino (300mg) resa 100%. Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 130,5-131,00 °C).

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3$ OSSALATO PM=526.46

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	52.47%	52.43%	0.04
H%	4.79%	4.75%	0.04
N%	10.64%	10.64%	0-

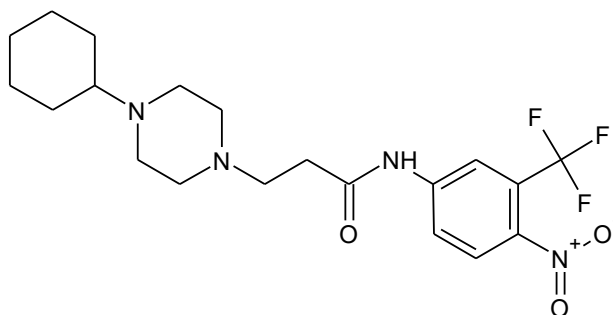
^1H NMR (CDCl_3) base libera

δ (ppm) 2.55-2.80 (m, 12H); 3.59 (s, 2H); 7.26-7.40 (m, 5H); 7.91-8.00 (m, 3H); 12.11 (br s, 1H).

^{13}C NMR (CDCl_3) base libera

δ (ppm) 32.23; 52.20; 53.13; 62.91; 117.94 (q, $J=5.62$ Hz); 121.60; 122.00 (q, $J=17.12$ Hz) 125.17 (q, $J=33.50$ Hz); 127.30; 127.34; 128.35; 129.11; 137.36; 143.19; 171.16.

3-(4-cicloesilpiperazin-1-il)-N-(4-nitro-3(trifluorometil)fenil)propanamide



MRAC 7

Ad una soluzione di 3-cloro-N-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]propanamide (200mg 0.67mmol) in MEK (15ml) vengono aggiunti KHCO_3 (101mg 1.008mmol) e 1-cicloesilpiperazina (112mg 0.67mmol) sotto agitazione magnetica e a 70°C per 16 ore. La reazione è stata monitorata con TLC con eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 7:3. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta, il residuo è stato ripreso in etilacetato e lavata ripetutamente con una soluzione satura di NaHCO_3 . La fase organica è stata anidrificata su Na_2SO_4 e concentrata a pressione ridotta. Il crudo di reazione è purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$. Si ottiene un prodotto giallo cristallino (321 mg) resa 97%. Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 128,8-129,01 °C).

$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_3$ OSSALATO PM=518.48

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	50.96%	50.92%	0.04
H%	5.64%	5.60%	0.04
N%	10.81%	10.80%	0.01

^1H NMR (CDCl_3) base libera

δ (ppm) 1.01 (m, 5H); 1.48 (m,5H); 2.16 (s, 1H); 2.18 (m, 12H); 7.80 (m, 3H); 12.09 (s,1H)

^{13}C NMR (CDCl_3) base libera

δ (ppm) 25.71; 26.18; 28.73; 32.18; 49.14; 52.58; 53.09; 63.39; 117.94; 121.60 (q, $J=17.12$ Hz); 127.34; 129.62; 143.25; 171.24.

Il vero dolore si sente fino in fondo all'anima.

PARTE 2

IL DOLORE NEUROPATICO

3.1 Classificazione del dolore.

Il dolore è una condizione patologica multifattoriale, non esiste una classificazione univoca adottata all'unanimità a livello internazionale; tuttavia è però possibile distinguere diversi sistemi di classificazione in base a specifiche caratteristiche come eziologia, localizzazione anatomica, interesse clinico e meccanismo fisio-patogenetico.

Tra i sistemi di classificazione più comunemente utilizzati vi sono: ¹¹⁰⁻¹¹¹

- Il criterio temporale che distingue il dolore in:
 - a) Acuto: cioè quello percepito improvvisamente in seguito ad una lesione (dal trauma all'intervento chirurgico), o comunque ad un evento in cui il rapporto causa/effetto è ben evidente. Prevalentemente di intensità severa, correlata all'entità del danno subito, si risolve, in genere, al risolversi della causa e, comunque, in un tempo inferiore a 30 giorni;
 - b) Cronico: è invece un dolore che dura da almeno 3 mesi o che comunque persiste oltre il normale periodo atteso di guarigione. Può iniziare come dolore acuto e prolungarsi per lunghi periodi a causa di differenti condizioni quali persistenza dello stimolo doloroso, aggravamento di una lesione od anche fenomeni di automantenimento, che mantengono quindi la stimolazione nocicettiva anche quando la causa iniziale si è limitata.
Questo tipo di dolore in realtà, può insorgere anche in assenza di una patofisiologia identificabile o di una patologia cronica grave, pertanto, influenzando negativamente la qualità della vita del paziente e determinando modificazioni affettive e comportamentali. Un esempio è il dolore cronico legato alle forme tumorali (dolore oncologico), che soprattutto nelle fasi avanzate della patologia, assume caratteristiche di dolore globale, una vera e propria sofferenza per il paziente;
 - c) Episodico o ricorrente: che può verificarsi in modo intermittente per un lungo periodo di tempo, può variare per intensità, qualità e frequenza nel tempo. Questo tipo di dolore è pertanto imprevedibile e può essere indistinguibile dal dolore acuto, avendo però un impatto più grave sul benessere fisico e psicosociale del soggetto;
 - d) Episodico intenso *breakthrough pain*: che è invece caratterizzato da un aumento temporaneo della severità algogena al di sopra di un livello basale di dolore pre-esistente. Si presenta solitamente in modo improvviso, con intensità severa e di breve durata, che può verificarsi in modo inaspettato e indipendente da qualsiasi stimolo, anche in assenza quindi, di un evento che lo precede o di un fattore scatenante. È una caratteristica nota del dolore oncologico, che si verifica però anche in condizioni dolorose non maligne.¹¹²⁻¹¹³
- Il criterio fisiopatologico, distingue invece il dolore in:¹¹⁴

- a) Nocicettivo: costituisce la risposta fisiologica ad uno stimolo algogeno che si manifesta quando il danno tissutale attiva i nocicettori. Generalmente ben circoscritto, si suddivide in somatico e viscerale, a seconda della localizzazione dei nocicettori attivati, infatti:
- I. Il dolore somatico è causato dall'attivazione dei nocicettori sui tessuti superficiali come cute, mucosa del cavo orale, naso, uretra, o profondi, come ossa, articolazioni, muscoli o tessuto connettivo. Ad esempio, tagli e stiramenti che causano rottura dei tessuti producono dolore somatico superficiale, mentre i crampi muscolari, dovuti a scarsità di ossigeno, producono un profondo dolore somatico,
 - II. Il dolore viscerale è invece causato dall'attivazione dei nocicettori localizzati nei visceri, quindi a livello dei vari organi interni. Può verificarsi in seguito ad infezione, distensione da fluidi o gas, tensione o compressione, ma anche per tumori solidi in patologie neoplastiche.
- b) Neuropatico o neurogeno: causato da danni strutturali e disfunzioni delle strutture nervose, sia del sistema nervoso periferico che centrale (SNP/SNC), pertanto qualsiasi processo morboso (metabolico, traumatico, infettivo, ischemico, infiammatorio, tossico, immuno-mediato), che causa danni alle cellule nervose, può rendersi protagonista di questa tipologia di dolore.¹¹⁵
- Il dolore neuropatico può essere costante o intermittente, spontaneo o provocato, ma in ogni caso tende ad essere una condizione patologica di lunga durata, che, proprio per le sue caratteristiche cliniche, viene accompagnato da tutta una serie di condizioni come depressione, disturbi del sonno ed altri danni funzionali.¹¹⁶
- c) Misto: con caratteristiche e sintomi sia del dolore nocicettivo che del dolore neuropatico, che possono quindi coesistere, in seguito alla contemporanea attivazione dei meccanismi fisio-patogenici di entrambe le tipologie, o presentarsi separatamente in momenti diversi.

A tale classificazione può essere aggiunto anche il dolore:

- d) Psicogeno o idiopatico, definizione generale per identificare tutti quei dolori di natura psicosomatica, privi di una causa organica ben caratterizzata, maggiormente riscontrabili in soggetti con carattere ansioso ed emotivo o che vivono situazioni di stress. Sono dolori che si auto perpetuano e durano a lungo anche quando l'evento scatenante viene totalmente superato. Studi clinici hanno evidenziato la correlazione

fra vari tipi di fattori stressanti e processi biologici, biochimici, neuroendocrini ed immunitari che possono correlarsi a questo tipo di dolore.

3.2 Il dolore neuropatico.

La più recente definizione di dolore neuropatico, formulata dall'International Association for the Study of Pain (IASP) è quella di un *dolore che nasce quale diretta conseguenza di una lesione o malattia del sistema somatosensoriale* (NeuPSIG-Special Interest Group on Neuropathic Pain).¹¹⁶⁻¹¹⁸

Dunque, il dolore neurogeno rappresenta una particolare forma di dolore cronico, causato da una lesione o disfunzione del sistema nervoso periferico o centrale.¹¹⁹ Originatosi all'interno del sistema nervoso, non segue la via fisiologica di trasmissione del dolore, costituendo un fenomeno totalmente patologico, causa di sindromi dolorose tra le più invalidanti, determinando sofferenza, disabilità e profonda compromissione della qualità della vita del paziente.¹¹⁶ Purtroppo non è ancora possibile, determinare l'eziologia del dolore neuropatico in base alle caratteristiche cliniche di questo dolore.¹²⁰ L'origine può essere organica, psicologica o una combinazione di entrambe, ma la relazione tra eziologia, patogenesi e sintomi risulta essere ancora molto complessa. Evidenze cliniche dimostrano che, in pazienti diversi, lo stesso sintomo può essere causato da più e diversi meccanismi contemporaneamente, così come un medesimo meccanismo, può essere responsabile di molti sintomi diversi nei vari pazienti, ed ancora, si può verificare, che la stessa condizione può essere dolorosa per alcuni pazienti e indolore per altri.¹²¹ Tutto ciò rende evidente l'attuale incompleta comprensione, dei meccanismi coinvolti nella condizione di dolore neurogeno, anche se, appare ormai chiaro, che questa tipologia di dolore cronico promuova un gran numero di modificazioni ed adattamenti persistenti, a livello cellulare e molecolare, permettendo di causare, a nervi e tessuti, dei cambiamenti nelle cellule nevoze (sia centrali che periferiche) che contribuiscono allo sviluppo del dolore cronico e ai sintomi ad esso associato.¹²² Inizialmente, gli studi riguardanti i possibili meccanismi scatenanti questa gravissima forma dolorosa, erano focalizzati sul ruolo della lesione nervosa periferica, e sui meccanismi che portano a tali cambiamenti, a livello esclusivamente periferico. Successivamente invece si capì come, per una migliore comprensione del processo algogeno, si dovessero focalizzare anche le modificazioni centrali indotte da tali lesioni periferiche.

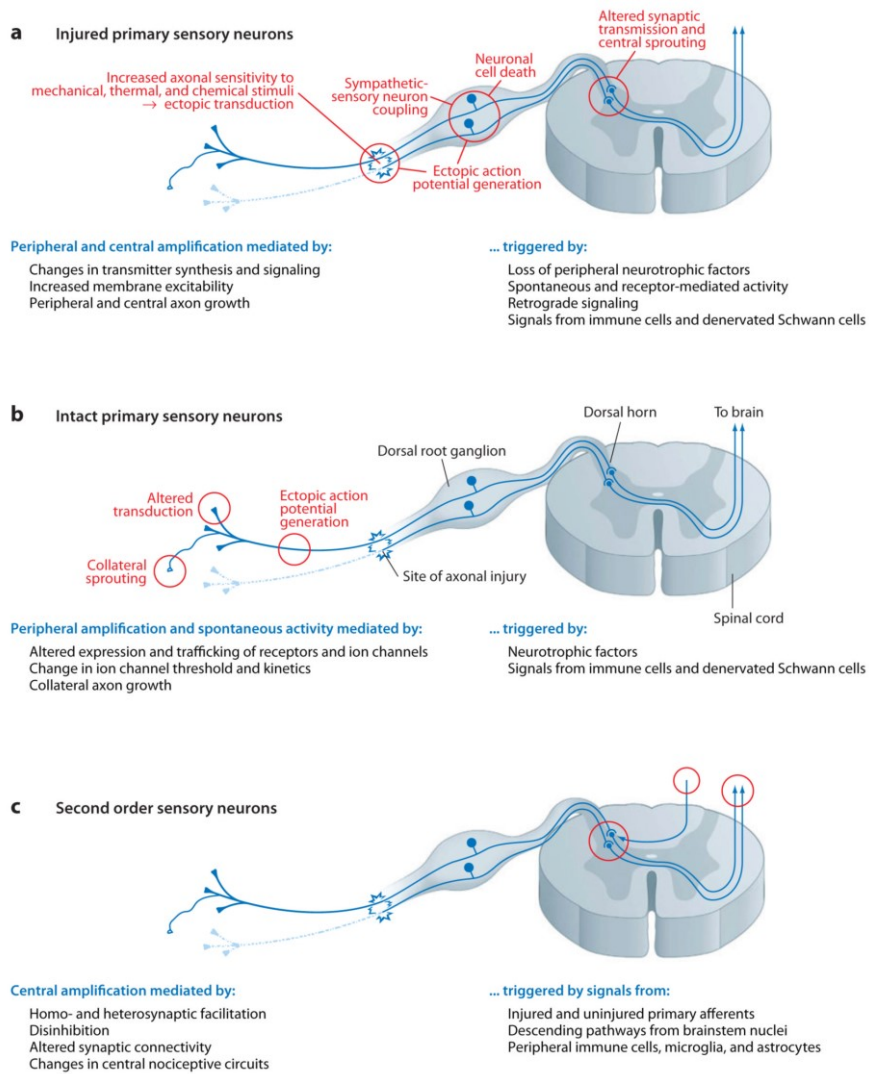


Fig. 3.1: Principali meccanismi periferici riguardanti lo sviluppo del dolore neuropatico. (Griffin e Woolf, 2007)

3.3 Meccanismi periferici

Il primo elemento, appartenente al SNP, che si depolarizza in seguito all'arrivo di un stimolo algico adeguato, è il neurone afferente del I ordine. In condizioni fisiologiche dunque questo primo elemento nervoso della via, genererà un potenziale d'azione solo se la stimolazione nocicettiva raggiunge la soglia di attivazione dei canali del sodio voltaggio dipendenti. In seguito alla lesione di un nervo periferico però i neuroni sensitivi (cellule a T del ganglio dorsale) diventano insolitamente eccitabili e sviluppano una spontanea e patologica attività, una abnorme eccitabilità ed un'elevata sensibilità a stimoli chimici, termici e meccanici non adeguati cioè anche sotto-soglia.

Questo fenomeno di "sensibilizzazione periferica" viene definita come *scarica ectopica* che può originare a livello dei gangli delle radici dorsali ma anche da tutti i tratti lungo il nervo danneggiato.¹²³⁻¹²⁴

Chiaramente osservate nell'uomo affetto da dolore neuropatico di varia natura, queste manifestazioni *ectopiche* furono originariamente analizzate in un neuroma, che ha consentito di definirne le caratteristiche. Naturalmente, anche le sostanze rilasciate dal tessuto danneggiato, giocano un ruolo fondamentale a livello periferico, in quanto possono sensibilizzare ed attivare i nocicettori, provocando una riduzione della soglia e la generazione di una *scarica ectopica* che porta ad un aumento sostenuto dell'eccitabilità.¹²⁵

3.4 Meccanismi centrali

La conseguente eccessiva attività spontanea originatasi in periferia contribuisce però in maniera determinante alla ristrutturazione dei circuiti centrali, in seguito alla lesione periferica.¹²⁶

A livello infatti del corno dorsale del midollo spinale, si verifica un riarrangiamento sinaptico, conseguente la lesione, che porta alla terminazione delle fibre afferenti mieliniche A β della normale sensibilità tattile, non più a livello delle lamine III e IV più profonde, ma a livello delle lamine I e II delle corna dorsali, proprio dove prendono contatto sinaptico le fibre afferenti nocicettive.¹²⁷ Questa ramificazione di fibre A β mieliniche, negli strati più superficiali delle corna dorsali, determina un'interpretazione errata delle informazioni sensoriali nel midollo spinale, facendole percepire come nocicettive (allodinia). Tutto ciò ha anche un risvolto nei meccanismi modulatori periferici in quanto, una diminuzione degli impulsi provenienti dalle fibre sensitive della sensibilità tattile, diminuisce l'attività degli interneuroni inibitori della nocicezione (Teoria del Cancellone).^{119,128}

Chiaramente, questa lesione periferica, porta i neuroni del tratto spino-talamico ad una ipereccitabilità definita come *sensibilizzazione centrale*, fondamentale per la genesi di un persistente dolore neuropatico, caratterizzata da fenomeni come riduzione della soglia di attivazione neuronale anche nei neuroni centrali, ed aumento della frequenza di scarica degli stessi in risposta ad una stimolazione periferica ripetuta e persistente. Alla luce di quanto detto, appare dunque chiaro che, in seguito a una lesione periferica, si verificano dei cambiamenti a livello centrale, che riguardano, soprattutto, la riorganizzazione dei circuiti neuronali e la sensibilizzazione centrale.¹²⁹ Per questi meccanismi fisiopatologici, la sede della lesione non può essere utilizzata a discriminazione della patologia, poiché i meccanismi neuropatici possono espandersi durante la malattia o coinvolgere sia la patofisiologia centrale che quella periferica. In seguito al danno ad un nervo periferico, ad esempio, il segnale di dolore, che origina inizialmente dal sito assonale lesionato, può coinvolgere nel tempo altre porzioni, dai gangli delle radici dorsali alle corna dorsali, ai neuroni di ordine superiore, fino a livello corticale. L'estensione dei fenomeni che generano il dolore sono dovuti alle lente reazioni biochimiche del sistema nervoso, per cui il dolore neuropatico dovrebbe essere considerato come una malattia nervosa progressiva. Sebbene le neuropatie e sindromi che causano il dolore neuropatico varino sostanzialmente, sia in termini di localizzazione anatomica che in termini di eziologia, i sintomi e i disturbi ad esso associato hanno in comune alcune caratteristiche cliniche, che ne permettono la diagnosi. Chiaramente le caratteristiche di questo dolore variano da paziente a paziente, ma in generale si manifestano sensazioni di dolore nella zona colpita con parziale o totale perdita della capacità sensoriale, differenti tipologie di dolore evocato, e descrittori specifici come aumento della sensazione dolorifica dopo stimolazione ripetuta e persistente, sensazioni di bruciore intenso e continuo, punture di spillo, crampi, scosse elettriche, disestesia definita come “allucinazioni tattili”, parestesia cioè sensazioni anomale anche nelle zone circostanti la sede primaria del dolore, e sintomi negativi come ipoestesia e ipoalgesia.¹³⁰⁻¹³²

In realtà due particolari sintomi, definiti positivi, oltremodo fastidiosi ed invalidanti, predominanti nelle differenti tipologie di dolore neuropatico, stanno attualmente assumendo un significato sempre più importante per la ricerca, in quanto potrebbero servire come metro di lettura per questo dolore, fornendo indizi preziosi per le caratteristiche fisiopatologiche e contribuire quindi, al miglioramento delle conoscenze su questa particolare tipologia di dolore cronico.¹³¹⁻¹³⁴

Questi sintomi sono l'allodinia e l'iperalgia, entrambi presenti in varie neuropatie periferiche e centrali che affliggono il 15-50% dei pazienti con dolore neuropatico. Per allodinia si intende il dolore suscitato da uno stimolo che normalmente non provoca dolore (quindi fisiologicamente non-nocicettivo), mentre per iperalgesia si intende un aumento della risposta al dolore prodotto da uno stimolo che normalmente provoca dolore (quindi fisiologicamente nocicettivo).¹³⁵ Quest'ultima viene

a sua volta distinta in iperalgesia primaria, quando questo incremento di risposta si verifica nel sito colpito, ed iperalgesia secondaria quando invece colpisce i tessuti circostanti.¹³⁶ È chiaro, che questi due sintomi positivi si estendono oltre il territorio di innervazione del nervo danneggiato.¹³⁶

Allodinia ed iperalgesia vengono generalmente classificate secondo le modalità sensoriali utilizzate per provocare dolore e quindi in stimoli meccanici (dinamici, puntiformi, e statici) e termici (freddo e caldo). Negli anni sono stati proposti diversi meccanismi molecolari alla base dell'ipereccitabilità neuronale e dell'allodinia, grazie anche ai molteplici studi preclinici effettuati.

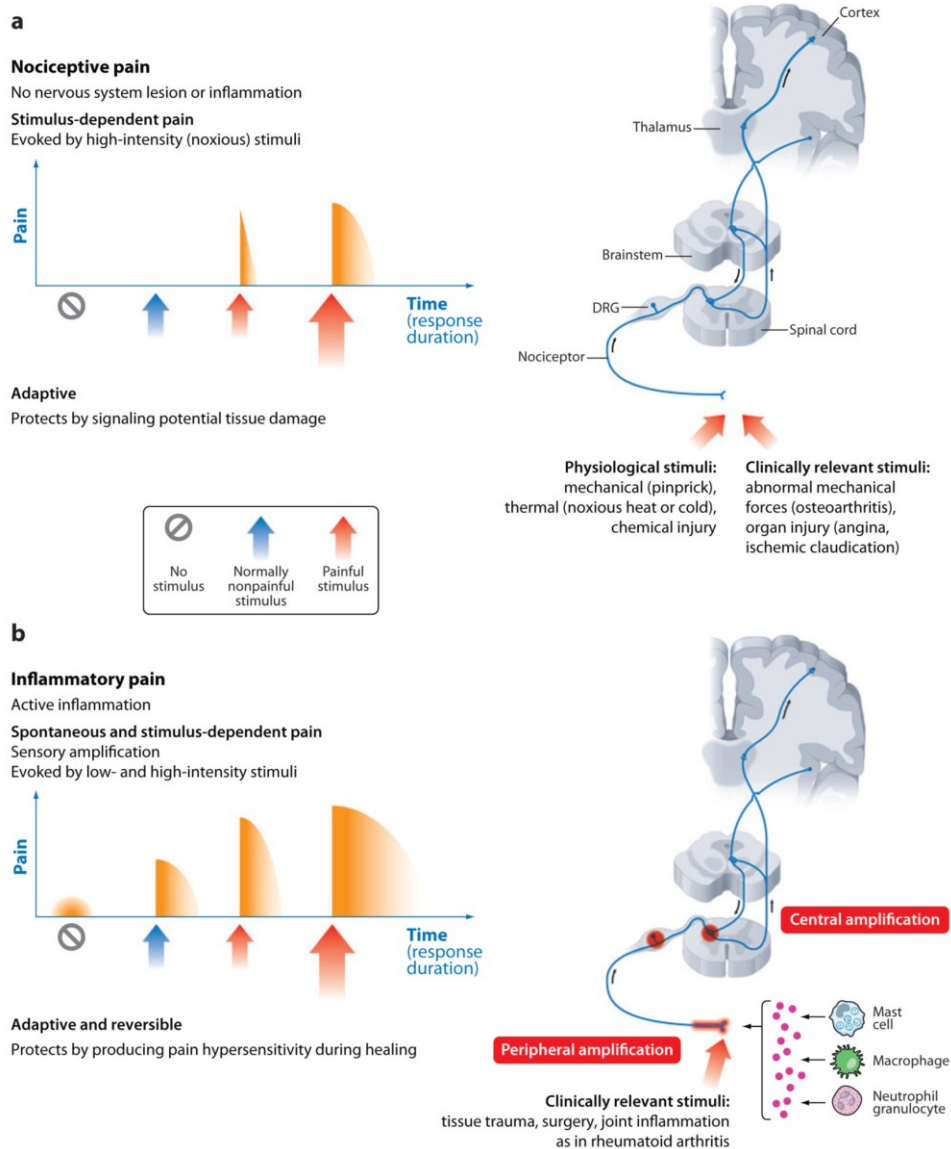
Tra questi, sicuramente il più accreditato, è quello che prende in considerazione la modificazione dell'espressione e del *trafficking* di differenti tipologie di canali ionici sia specifici, e quindi peculiari per le varie modalità sensoriali, che non specifici come quelli per il sodio e potassio che hanno, importanza critica, per ciò che concerne la fisiologia dell'eccitazione delle membrane.¹³⁷⁻¹³⁸

Dopo la lesione di un nervo periferico infatti, questa modificazione diventa una vera e propria *driving force* per la sensibilizzazione centrale e le sue espressioni cliniche, con diffusione *ectopica* del dolore (al di fuori del territorio innervato dal nervo danneggiato), aumento della percezione algogena a stimoli di medesima intensità, e ovviamente persistenza della sensazione dolorifica anche quando la stimolazione è cessata. Le principali patologie note in clinica, con le quali il dolore neuropatico può manifestarsi sono moltissime, anche se il 50% delle neuropatie che affliggono i pazienti sono attualmente definite come criptogeniche o idiopatiche, poiché non se ne conoscono ancora le cause. Il diabete ad esempio costituisce la causa più frequente di neuropatia al mondo, ma sono altrettanto interessate tutta una serie di stati patologici e disturbi come:

- Forme infettive come lebbra, virus dell'epatite C, malattia di Lyme o Borreliosi; virus dell'HIV, virus herpetico (Herpes Zoster);
- Neuropatie post-ictus e in seguito a lesioni nervose;
- Disfunzioni endocrine come ipo- o iper-tiroidismo;
- Patologie ereditarie come la malattia di Fabry, l'amiloidosi e la malattia di Tangier;
- Malattie metaboliche (diabete);
- Neuropatia associata a patologie neoplastiche;
- Patologie immunitarie ed immuno-mediate come la sclerosi multipla, sindrome di Sjogren;
- Sindrome dell'arto fantasma post-amputazione;
- Ipo/ipervitaminosi;
- Esposizione ad inquinanti tossici come alcool, arsenico, tallio, acrilamide e solventi organici;
- Patologie infiammatorie, tanto è vero che, non sempre è possibile fare una netta distinzione tra dolore cronico di tipo infiammatorio e dolore neuropatico, in quanto le componenti tipiche di

un processo infiammatorio cronico possono presentarsi e diventare parte integrante dei meccanismi che regolano il dolore neuropatico. Ovviamente, allo stesso modo, le lesioni neuronali possono causare una reazione infiammatoria (infiammazione neurogena) che contribuisce al manifestarsi di un dolore infiammatorio.

Sono state descritte, in ambito clinico, una serie di neuropatie definite iatrogene cioè indotte da farmaci. In particolare, come noto da vari studi, diversi farmaci antineoplastici (vincristina, cisplatino, oxaliplatino) spesso inducono una neurotossicità periferica dose limitante e clinicamente significativa.¹³⁹⁻¹⁴¹ Nello specifico, il paclitaxel, un chemioterapico di prima linea per il trattamento di varie forme cancerose, produce spesso neuropatie periferiche dolorose con intorpidimento, allodinia da freddo, formicolio, bruciore, e sindrome calza-guanto.¹⁴²⁻¹⁴⁴



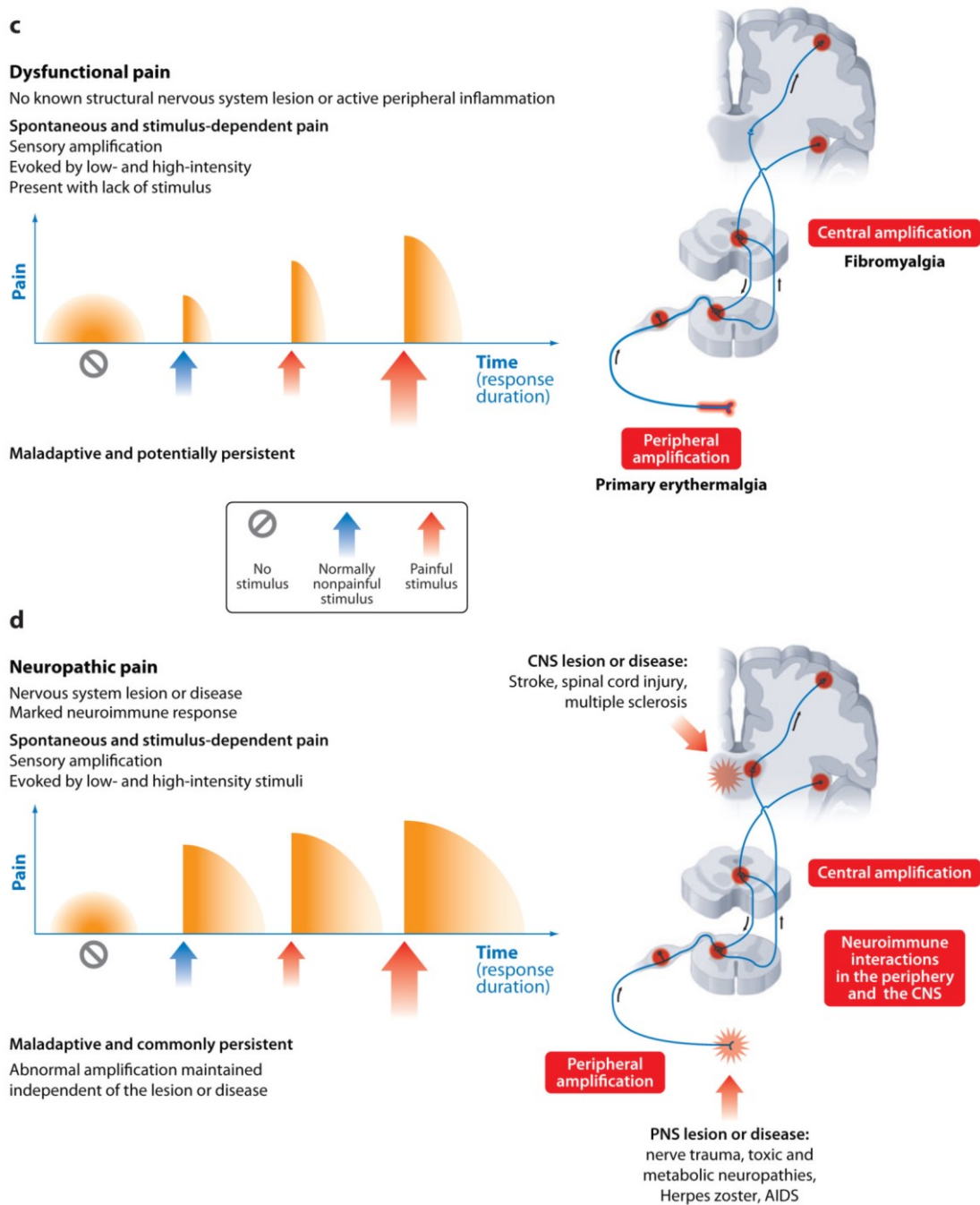


Fig.3.2: Schema riassuntivo delle 4 maggiori sindromi dolorifiche: a) dolore nocicettivo; b) dolore infiammatorio; c) dolore disfunzionale; d) dolore neuropatico. (Griffin e Woolf, 2007)

3.5 La nocicezione.

La sensazione del dolore origina da una eccessiva stimolazione degli stessi recettori che generano le normali sensazioni meccaniche e termiche. La nocicezione, e quindi la percezione del dolore, utilizza recettori e percorsi nervosi completamente distinti da quelli delle altre percezioni somatosensoriali, anche se chiaramente vi sono aspetti comuni nel processo di trasduzione e trasmissione

dell'informazione.¹¹⁹

Il dolore fisiologico è quindi il risultato dell'attivazione di una particolare sottoclasse di recettori periferici a lento adattamento, definiti nocicettori (dal latino noxa=danno), proposti da Sherrington circa un secolo fa, specializzati nel riconoscimento di stimoli nocivi, quindi in grado di produrre danno tissutale.¹⁴⁵ Tali nocicettori sono costituiti da terminazioni periferiche libere ed arborizzate di neuroni sensoriali pseudounipolari (neuroni a T), i cui corpi cellulari sono situati nei gangli delle radici dorsali del MS o dei nervi cranici, i quali proiettano l'assone centrale a livello del SNC e quello periferico nelle zone da innervare per poter raccogliere lo stimolo.

Questi vengono definiti come neuroni di I ordine, in quanto costituiscono il primo elemento nervoso, del circuito trineuronico, che convoglia lo stimolo dolorifico, dalla periferia alla corteccia, mediante le vie spino-talamiche.

Nell'uomo si distinguono diversi tipi di nocicettori: ^{119,128}

- Nocicettori mecano-sensibili: attivati esclusivamente da stimoli di natura meccanica e costituiti da fibre A δ di piccolo diametro dotate di una sottile guaina mielinica, che conducono alla velocità di 6-30 m/s,
- Nocicettori mecano-termici: sensibili non solo agli stimoli meccanici ma anche a quelli termici dannosi, costituiti anch'essi da fibre mieliniche del tipo A δ ,
- Nocicettori polimodali: che rispondono appunto in maniera polimodale a stimoli meccanici, termici e chimici dannosi (in particolare ioni H⁺, bradichinina, derivati dalla cascata ciclossigenasica e lipossigenasica dell'acido arachidonico), costituiti da fibre C di piccolo diametro, non mielinizzate, che conducono alla velocità di 0,5-2 m/s.
- Nocicettori silenti: ultimi identificati, costituiti da fibre del tipo A δ e C che, in condizioni basali, sono insensibili anche a stimoli intensi meccanici e termici, ma rispondono agli stessi dopo sensibilizzazione ad opera di sostanze chimiche, per esempio liberate durante l'infiammazione.

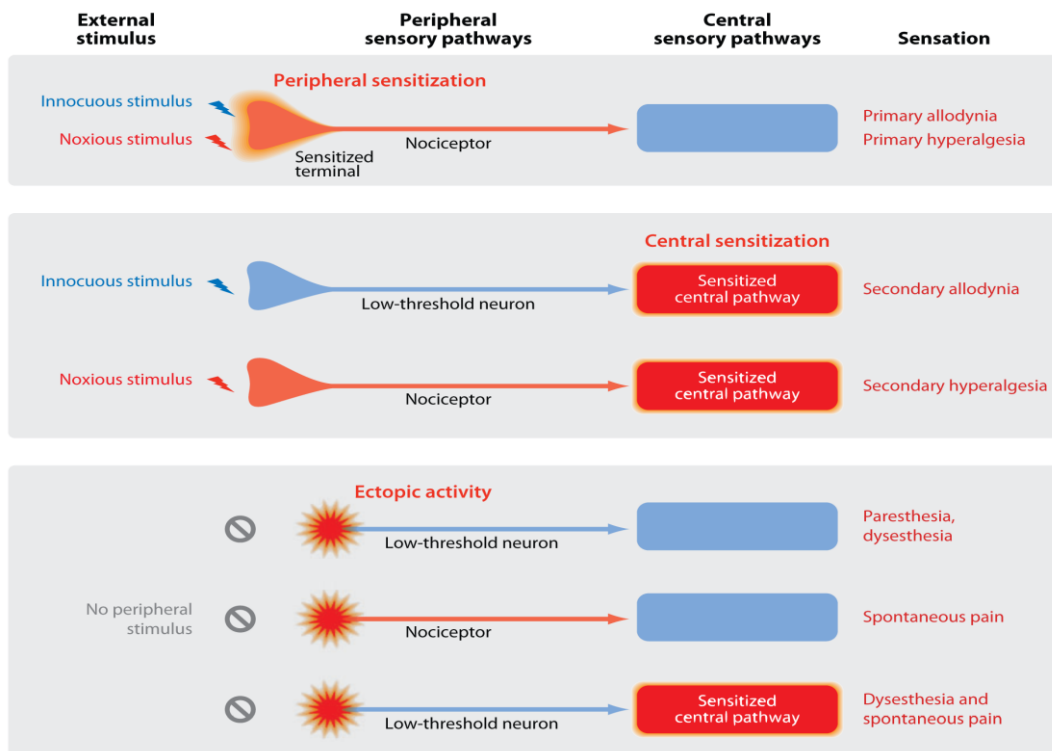


Fig. 3.3: Rappresentazione visiva della relazione tra insulto esterno e/o insulto esterno innocuo e la conseguente risposta sensoriale. La risposta sensoriale che ne deriva dipende da quale fibra afferente viene attivata (nocicettori o neuroni a bassa soglia). L'impulso viene elaborato sia a livello del SNP che a livello SNC con conseguente generazione dei relativi meccanismi sensoriali.

È evidente che, a seguito di queste differenze, nelle caratteristiche anatomico-funzionali e nella velocità di conduzione delle fibre interessate, l'attivazione dei nocicettori produce due distinte percezioni del dolore: il primo dolore viene definito come acuto e lancinante, causato dall'attivazione delle fibre A δ mieliniche, mentre il secondo dolore viene definito come urente, più tardivo e di lunga durata, causato invece dalle fibre C amieliniche.¹⁴⁶

3.6 Modulazione del dolore: le vie ascendenti.

Dopo aver raccolto lo stimolo dolorifico dalla periferia, le fibre afferenti del neurone del I ordine entrano nel midollo spinale attraverso le radici posteriori, e terminano nella sostanza grigia delle corna dorsali dove contraggono sinapsi con i neuroni del II ordine. La maggior parte delle fibre nocicettive (sia A δ che C) terminano negli strati più superficiali del corno dorsale, che comprende la zona

marginale (lamina I) e la sostanza gelatinosa del Rolando (lamina II), mentre alcune fibre A δ mieliniche proiettano anche più profondamente, terminando a livello della lamina V.

Le più importanti vie ascendenti dell'informazione algogena, che prendono origine da lamine diverse del midollo spinale, sono: ¹²⁸

1. La *via spino-talamica*: rappresenta una via rapida di conduzione del dolore in quanto proietta direttamente al talamo ed è responsabile degli aspetti sensoriali e discriminativi della percezione dolorifica. Questa si origina dai neuroni delle lamine I e V-VII del corno dorsale, con cui i neuroni del I ordine hanno preso contatto sinaptico, le cui fibre spino-talamiche si incrociano a livello spinale ed ascendono nella sostanza bianca del cordone spino-talamico anteriore e laterale controlaterale.

In entrambi questi fasci sono contenute due diverse vie differenziate in:

a) la *via paleo spino talamica*, così definita perché filogeneticamente più antica, che proietta al talamo mediale e trasmette segnali nocicettivi provenienti prevalentemente dalle fibre C, ai nuclei reticolari del bulbo, ponte e mesencefalo, e all'area tettale mesencefalica, dove vengono attivati neuroni del III° ordine che trasmettono le informazioni dolorifiche ai nuclei intralaminari del talamo mediale,

b) la *via neo spino talamica* invece, filogeneticamente più recente e massimamente sviluppata nei primati, transita dal midollo spinale attraversando tutto il tronco dell'encefalo, senza contrarre sinapsi con i nuclei ivi presenti fin quando non raggiunge il talamo, dove trasmette prevalentemente segnali del dolore "puntorio" al complesso ventro-basale ed al nucleo ventro-postero-laterale di tale formazione;

2. La *via spino-reticolare*: costituisce un sistema a più lenta velocità di conduzione che proietta alla formazione reticolare del tronco encefalico e ancora una volta al talamo mediale. E' formata dagli assoni dei neuroni nocicettivi della lamina VII e VIII che attraversano la linea mediana e si portano nel quadrante antero-laterale del midollo spinale controlaterale, dove proiettano, in parte direttamente al talamo, mentre una porzione di fibre contrae sinapsi con la formazione reticolare del bulbo terminando infine sempre al livello del talamo mediale;
3. La *via spino-mesencefalica*: formata infine, dai neuroni nocicettivi che originano dalle lamine I e V del midollo spinale. Due terzi di tali fibre si decussano sulla linea mediana per salire nei quadranti anterolaterale e dorsolaterale del midollo spinale, dove proiettano alla formazione reticolare del mesencefalo e alla parte laterale della Sostanza Grigia Periacqueduttale (PAG), terminando infine al talamo mediale.

Quindi il talamo rappresenta una stazione di passaggio di fondamentale importanza per le vie nocicettive ascendenti, anche se in realtà il suo ruolo è notevolmente più ampio in quanto, in generale, costituisce un centro di analisi, integrazione e controllo per tutte le afferenze sensoriali (tranne quelle olfattive). Giunte al talamo, le informazioni dolorifiche raccolte dalla periferia, vengono finalmente trasmesse alla corteccia cerebrale, dove raggiungono la soglia di coscienza. Nello specifico queste vengono convogliate alla corteccia somatosensoriale primaria (S-I), subito dietro il solco centrale del Rolando, e alla corteccia somatosensoriale secondaria (S-II) del lobo occipitale, dove vengono elaborate e quindi generate le risposte opportune. Un aspetto molto interessante della elaborazione della percezione dolorifica, è però il coinvolgimento di strutture pre-frontali e frontali, della corteccia insulare e cingolata, ed in particolare del sistema limbico, centro di controllo della sfera emotiva e comportamentale. Alcuni nuclei talamici infatti, in particolare quelli anteriori, appartengono proprio al sistema limbico, così come la PAG, sopraccitata, si connette a tale sistema attraverso l'ipotalamo. Questo giustifica come i meccanismi dell'emozione e del comportamento siano responsabili della componente emotiva del dolore, entrando quindi prepotentemente in quella che è la percezione della sensazione dolorifica. Pertanto, le vie nervose che trasmettono le informazioni algogene alle strutture cerebrali, possono essere distinte in due componenti:¹¹⁹

- La componente sensitivo-discriminativa, che segue le vie nervose afferenti appena citate, risulta essere uguale in tutti gli individui sottoposti a medesimi stimoli di pari intensità, e ci permette quindi di segnalare la localizzazione, l'intensità e la qualità dello stimolo nocicettivo;
- La componente affettivo-motivazionale, che coinvolge invece le sue diffuse proiezioni in particolar modo con il sistema limbico, e segnala la spiacevole qualità dello stimolo, responsabile quindi della notevole variabilità di risposta in diversi soggetti sottoposti a identici stimoli dolorifici;

Il dolore è quindi un fenomeno multidimensionale con componenti sensoriali, fisiologiche, cognitive, affettive, comportamentali e spirituali. Le emozioni (componente affettiva), le risposte comportamentali al dolore (componente comportamentale), le credenze, le attitudini spirituali e culturali, e il controllo del dolore (componente cognitiva), alterano la modalità in cui l'esperienza dolorosa è vissuta (componente sensoriale) modificando la trasmissione dello stimolo doloroso (spiacevole) al cervello (componente fisiologica).¹¹⁴

3.7 La modulazione del dolore: le vie discendenti.

La sensazione dolorifica non dipende solo dai segnali afferenti raccolti dalle strutture recettoriali, ma anche da meccanismi di controllo del dolore sia periferici che centrali.^{119,128} A livello del SNC vi sono infatti, una serie di circuiti modulatori che regolano, positivamente o negativamente, la percezione degli stimoli nocivi giustificando la estrema variabilità della risposta. La prima stazione fondamentale di modulazione si trova a livello della sostanza gelatinosa di Rolando del corno dorsale del MS dove, come già visto, vi sono ampie interconnessioni tra fibre afferenti nocicettive e fibre afferenti non nocicettive, che controllano quindi la trasmissione dell'informazione dolorifica ai centri superiori.¹⁴⁷

La prima ipotesi infatti, che il dolore non derivasse semplicemente dalla attività delle fibre nocicettive, ma dall'interazione di queste con fibre afferenti mieliniche A β meccanocentriche non implicate nella nocicezione, fu avanzata intorno al 1960, quando studi di neuro-fisiologia dimostrarono che la stimolazione di fibre mieliniche A β e A δ a bassa soglia, riduceva la risposta dei neuroni nocicettivi del corno dorsale, mentre il blocco di tali fibre mieliniche implicava la comparsa di risposte dolorifiche potenti. Tale teoria fu definita come “*gate control theory*” (teoria del controllo a cancello) postulata da Patrick Wall e Ronald Melzack nel 1965, secondo la quale, la sensazione dolorosa è il risultato del bilanciamento tra le informazioni di fibre afferenti mieliniche meccanocentriche, fibre afferenti amieliniche C nocicettive, e un piccolo interneurone inibitorio, che giungono a livello di una ben precisa area delle corna dorsali del MS definito appunto come “*gate*”(cannello).¹⁴⁸ Considerando infatti, a tale livello, la disposizione dei contatti sinaptici, è stata ipotizzata la presenza, di questo piccolo interneurone inibitorio interposto tra i neuroni di I e II ordine, il quale prende contatto sinaptico sia con le fibre nocicettive di tipo C ed il soma del neurone spino-talamico della via ascendente nocicettiva, sia con le fibre A β mieliniche non nocicettive. Quando attivato, tale interneurone, ha la capacità di inibire l'attività del neurone di II ordine della via ascendente, di conseguenza, in queste condizioni, lo stimolo dolorifico viene annullato o comunque percepito dal SNC in maniera molto meno intensa. Ad attivare questa struttura nervosa sono certamente le fibre A β mieliniche meccanocentriche non nocicettive, pertanto l'attivazione simultanea alle fibre nocicettive permetterà di attenuare fortemente la sensazione dolorifica trasmessa al SNC, proprio perché in questo caso il “*gate*” risulta essere chiuso; questo spiega infatti perché, massaggiando una zona del corpo accidentalmente urtata, proviamo un certo sollievo.^{119,128}

Sicuramente un antagonismo alla nocicezione maggiore di quello prodotto a livello periferico, si verifica in seguito alla stimolazione di una specifica area mesencefalica detta Sostanza Grigia Periacqueduttale (PAG), coinvolta nel meccanismo di modulazione centrale del dolore. Esistono infatti chiare evidenze sperimentali che, la stimolazione di tale area produce una specifica e profonda

analgesia. Il blocco del dolore avviene perché, la PAG, che riceve impulsi da strutture differenti quale la corteccia, il talamo, l'ipotalamo ed altre, attiva fibre discendenti che arrivano sino ai neuroni nocicettivi del corno posteriore del MS. Sebbene infatti, una piccola porzione della PAG proietti direttamente al MS, il maggior contingente di fibre si dirige ai neuroni della regione rostro-ventrale del bulbo ed in particolar modo ad un nucleo di neuroni serotoninergici definito nucleo del Rafe Magnus, e al nucleo reticolare magnocellulare (NRMC).

I neuroni presenti in tali nuclei inviano fibre discendenti, decorrendo nella parte dorsale del funicolo laterale, proprio a livello della sostanza gelatinosa del Rolando delle corna dorsali del midollo spinale, prendendo contatto sinaptico con gli interneuroni inibitori, che vengono dunque attivati dalla serotonina rilasciata.¹⁴⁹⁻¹⁵⁰ L'interneurone inibitorio attivato rilascia una serie di peptidi appartenenti ad una particolare famiglia di trasmettitori definiti peptidi oppioidi endogeni, la cui caratterizzazione ha rappresentato una delle più entusiasmanti scoperte in campo neurofarmacologico.¹¹⁹ A livello spinale, questi peptidi rilasciati (in particolare encefaline, dinorfine e l'ultima identificata nocicettina), si comportano da neurotrasmettitori inibitori, mediando una profonda analgesia grazie all'attivazione dei tre sottotipi del recettore oppioide (ma soprattutto i MOP), ampiamente espressi a questo livello, mediante meccanismi sia pre- che post-sinaptici. Nella terminazione assonale della fibra nocicettiva infatti, l'attivazione dei recettori oppioidi determina un blocco dei canali per il Calcio voltaggio-dipendenti di tipo N e P/Q che controllano il rilascio dei neurotrasmettitori eccitatori, mediatori del dolore, come la sostanza P e il glutammato, nella fessura sinaptica.¹¹⁹ Nella membrana del corpo cellulare del neurone del II ordine invece, l'interazione di tali sostanze con le proprie strutture recettoriali, determina l'attivazione di canali per il potassio che mediano quindi iperpolarizzazione, bloccando la trasmissione dell'impulso e allontanando il neurone dalla soglia di eccitazione. A livello sovraspinale invece, tali peptidi oppioidi endogeni si comportano da neurotrasmettitori eccitatori, attivando l'elevatissima quantità di recettori oppioidi, con percentuale nettamente a favore dei MOP, in particolare proprio a livello della PAG che quindi, oltre il suo determinante ruolo, appena analizzato, nel meccanismo di inibizione discendente del dolore, rappresenta un importantissimo sito d'azione dell'analgesia sovraspinale indotta da oppioidi.^{119,128}

3.8 Sistema oppioide: caratteristiche generali.

Gli analgesici oppioidi, costituiscono oggi, una fondamentale classe di farmaci impiegati per “la terapia del dolore”, utilizzati quindi in pratica clinica per la modulazione di una vasta tipologia di algie di intensità medio-alta sia acute che croniche. Risultano essere strumenti farmacologici di prima linea per il trattamento del dolore severo, che si presenta in seguito ad interventi chirurgici e, certamente, nelle sintomatologie dolorifiche sorde e persistenti che accompagnano differenti stati patologici degenerativi, come l’artrite reumatoide, oncologici quali neoplasie all’ultimo stadio e neurologici quali in particolare, il dolore cronico di tipo neuropatico.

La morfina è un alcaloide dell’oppio, isolata per la prima volta già nel 1803, rappresenta ancora oggi il capostipite dei ligandi oppioidi naturali, tutt’ora ampiamente utilizzata in clinica nel trattamento del dolore importante. È stata la prima molecola ad essere utilizzata come prototipo di farmaco analgesico, che ha incoraggiato negli anni ’40 e ’50 un vasto programma di ricerca volto ad individuare nuovi targets, nel tentativo di produrre farmaci con attività antalgica ad essa paragonabile.¹⁵¹ Sulla base degli studi effettuati nell’ambito delle sue caratteristiche chimico-strutturali, negli anni ’70 vennero sviluppati dei composti in grado di antagonizzare gli effetti farmacologici della morfina. È stato possibile, per la prima volta, confermare l’esistenza di recettori per gli oppioidi, e dunque l’ipotesi che, per poter elicitarne i loro effetti, gli alcaloidi dovessero interagire con specifici siti recettoriali.

Nel 1973, il gruppo di ricerca di Martin e Snyder, mediante studi di binding effettuati con composti ad attività oppioide aventi strutture chimiche differenti, postulò l’esistenza di almeno tre diverse classi recettoriali, in seguito al variabile profilo farmacologico mostrato dalle molecole in esame.¹⁵²⁻¹⁵⁴

I recettori così identificati, denominati in base alla elevata affinità esibita per il particolare ligando saggiato, vennero pertanto distinti in:

- μ per la particolare affinità per la morfina;
- κ per la ketociclazocina;
- σ per la rilevante affinità per la N-allilnormetazocina o (\pm)-SKF-10,047, il quale fu inizialmente annoverato tra i recettori oppioidi, e successivamente eliminato dalla suddetta famiglia.¹⁵¹

Chiaramente, la presenza di tali recettori oppioidi nel SNC, ha costituito il presupposto per la ricerca di sostanze endogene in grado di attivare tali strutture recettoriali, aventi di conseguenza un’attività morfino-simile. Nel 1975 Hughes e Kosterlitz,¹⁵⁵ attraverso una serie di studi, riuscirono ad isolare ed identificare, da estratti di cervello di maiale ed altri mammiferi, due pentapeptidi definiti come [Met⁵]-enkefalina, e [Leu⁵]-enkefalina (da “Kefalè” derivato dalla testa), con attività oppioide del tutto simile alla morfina.¹⁵⁶

Tramite studi di stimolazione elettrica effettuati sul vaso deferente del topo (mouse vas deferent MVD), particolarmente sensibile alla inibizione da parte degli oppioidi, questi autori, appurarono l'elevatissima potenza esibita da tali composti endogeni rispetto alla morfina e congeneri, portando a postulare quindi l'esistenza di una terza classe di recettori oppioidi denominati Delta (δ) da deferens, proprio per la sua elevata espressione a livello del MVD.

La scoperta delle due encefaline, fu ben presto seguita dalla identificazione e caratterizzazione di altri peptidi endogeni ad attività oppioide. La conferma dell'esistenza di un' ampia varietà di sostanze endogene ad attività morfino-simile, pur non condividendone affatto le caratteristiche strutturali, si deve ad Akil e collaboratori, i quali scoprirono che il naloxone, antagonista non selettivo, ma con maggiore affinità per i μ , era in grado di antagonizzare l'analgesia indotta mediante stimolazione elettrica di alcune aree cerebrali come la PAG, deducendo pertanto che, in condizioni di stress, dovesse verificarsi il rilascio di tali sostanze con azione analgesica sui recettori per gli oppioidi.¹⁵¹

3.9 Peptidi oppioidi endogeni.

Sono stati identificati circa 15 peptidi endogeni con attività analgesica, il cui numero è probabilmente destinato a salire. Si tratta di molecole di natura peptidica, prodotte quindi secondo le classiche tappe della sintesi proteica, con lunghezza variabile, ma accomunati da una elevata omologia nella loro sequenza primaria. I principali composti finora identificati derivano da tre diversi precursori proteici inattivi, codificati da tre geni altrettanto differenti, e sono la Pro-opiomelanocortina (POMC), la Proencefalina A e la Proencefalina B anche detta Prodinorfina.^{151,157-158}

La POMC, precursore di 265 amminoacidi, principalmente prodotto nel lobo intermedio della ghiandola pituitaria, contiene al suo interno la sequenza del peptide oppioide endogeno biologicamente attivo definito β -endorfina, estratta per la prima volta da Goldstein e collaboratori.¹⁵⁹ In tale precursore, sono incorporate le specifiche sequenze di altri peptidi attivi con differente attività, quali l'ACTH (adenocorticotropo), l' α - β - γ - MSH (melanotropina), e la β -LPH (β -lipotropina) dalla quale appunto deriva il frammento della β -endorfina.

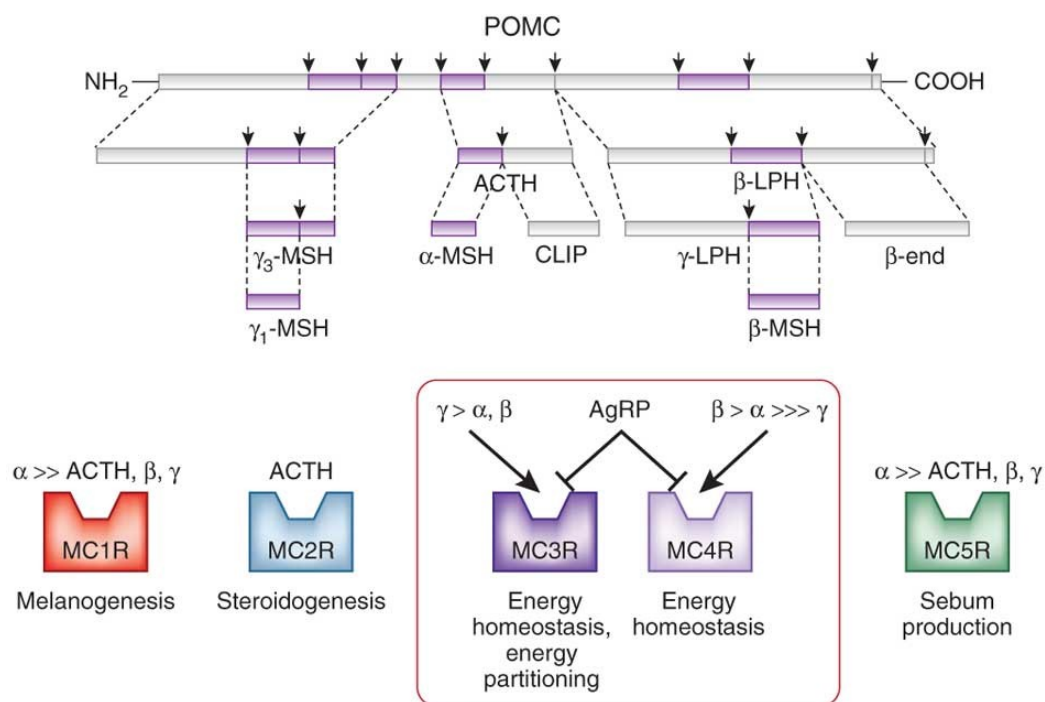


Fig. 3.4: POMC, processo post-trascrizionale per la sintesi biologica di peptidi attivi.

La proencefalina A invece, isolata per la prima volta dalla corteccia surrenalica bovina, è un peptide di 263 amminoacidi contenente la sequenza di due eptapeptidi (MERF e MERGL) ed inoltre quattro frammenti di [Met⁵]-enkefalina ed una sequenza di [Leu⁵]-enkefalina, i primi ad essere stati scoperti. Infine, la Proencefalina B o Prodinorfina, precursore costituito da 256 amminoacidi, è stato isolato in molti tessuti di mammifero come: la ghiandola surrenale, organi riproduttivi ed ovviamente

il SNC sia a livello dell'encefalo, in particolare nell'ipofisi, nel midollo spinale dove contiene una sequenza formata da differenti peptidi biologicamente attivi come la dinorfina A(1-17), la dinorfina A(1-8), la dinorfina B-29, la dinorfina B(1-13), e l' α -neoendorfina e β -neoendorfina.

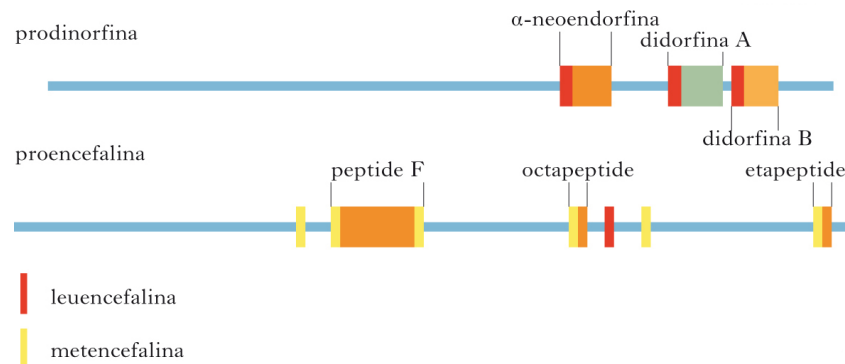


Fig. 3.5: Precursori inattivi peptidi oppioidi endogeni: pro-dinorfina e pro-encefalina.

Analizzando le sequenze amminoacidiche primarie di tali sostanze, si può ben notare che tutti possiedono, nella porzione N-terminale, il medesimo frammento tetrapeptidico iniziale costituito dagli amminoacidi *Tyr-Gly-Gly-Phe*.

Questa particolare sequenza viene definita come “*Message Domain*” cioè portatore del messaggio, coinvolta quindi nell’attivazione recettoriale e dunque essenziale per l’attività analgesica.¹⁵¹

Studi di correlazione struttura attività effettuati in particolar modo proprio sulle encefaline mostrarono come la Tyr¹, in posizione 1, fosse essenziale per l’attività oppioide, confermato da studi di correlazione struttura-attività svolti sulla molecola della morfina, nella quale per l’appunto, può essere rintracciato lo scheletro di tale aa, mimandone quindi la posizione N-terminale.

Anche la presenza della Phe⁴ in posizione 4, intervallato dalle due glicine che conferiscono la distanza ottimale dalla tirosina, è determinante per l’attività, la sua rimozione di fatto causa perdita delle proprietà analgesiche.

La porzione C-terminale invece è estremamente variabile, ed è stata definita “*Address Domain*” in quanto svolge il ruolo di indirizzo. Essa contiene le informazioni strutturali in grado di conferire al peptide la selettività per i vari sottotipi recettoriali, infatti, in particolare per quanto concerne i peptidi presi in analisi, è stato appurato che:¹⁵¹

- la β -endorfina, potentissimo biopeptide con proprietà analgesiche superiori alla morfina e l'unico con buona attività in vivo, presenta una elevata affinità per tutti i sottotipi recettoriali con particolare selettività però per i μ e δ ,¹⁶⁰
- le encefaline, in grado di indurre in vivo una profonda analgesia nel ratto sebbene velocemente degradate da proteasi presenti nelle strutture cerebrali e nel torrente ematico, vengono considerati ligandi endogeni per i recettori δ mostrando, seppur in misura minore, affinità anche per i recettori μ ;
- le dinorfine invece, anch'essi caratterizzati da una breve emivita in vivo, rappresentano dei ligandi endogeni particolarmente selettivi per i recettori κ oppioidi.¹⁵⁹

Nel 1997 inoltre, sono stati identificati due nuovi peptidi, il cui precursore non è ancora stato identificato, definiti come Endomorfina I ed Endomorfina II (endogeno+morfina).¹⁶¹

Si tratta di tetrapeptidi in cui il secondo e terzo amminoacido del *Message Address* sono differenti dai precedenti rappresentanti, possedendo comunque le caratteristiche strutturali essenziali per l'attivazione recettoriale e mostrando, in particolare, selettività per il recettore MOP.

I peptidi oppioidi endogeni, sebbene caratterizzati da una differente distribuzione a livello del SNC, sono tutti localizzati in regioni ed aree fortemente implicate nella elaborazione e modulazione dei meccanismi nocicettivi.^{119,151}

Terminazioni nervose contenenti encefaline e dinorfine sono state infatti rinvenute in aree coinvolte nella percezione e trasmissione delle informazioni dolorifiche, sia a livello sovraspinale, ed in particolare nella PAG e nella regione rostro-ventrale del bulbo, sia a livello spinale e nello specifico proprio nelle terminazioni degli interneuroni inibitori posizionati nelle lamine superficiali I e II del corno dorsale. Una elevata espressione è stata rilevata anche in regioni coinvolte nella modulazione del comportamento affettivo e della memoria quali il nucleo accumbens, l'amigdala, l'ippocampo e la corteccia cerebrale. Le β -endorfine invece, nel SNC, risultano essere particolarmente presenti nei neuroni dell'ipotalamo che inviano proiezioni, alla PAG, al nucleo accumbens, al talamo mediale e all'amigdala, ed inoltre nei nuclei noradrenergici del tronco encefalico, quali il locus coeruleus, da cui originano fibre noradrenergiche che vanno a innervare le corna dorsali. Alla luce di quanto detto, pertanto, risulta chiaro che tali sostanze endogene esercitino la loro azione analgesica a livello sia dei siti spinali che sovraspinali, mediante interazione con le relative strutture recettoriali.

3.10 Recettori oppioidi.

Sono state identificate tre classi di recettori per gli oppioidi, distinti, secondo la più antica nomenclatura, in μ , δ , e κ , tutti ben caratterizzati e clonati.¹⁶²⁻¹⁶⁴

Nel 1996 la IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology) propose però, per tali strutture recettoriali, una nuova nomenclatura basandosi sull'ordine della loro clonazione.¹⁶⁵

A tal proposito il recettore δ , sebbene ultimo identificato, è stato il primo dei recettori oppioidi ad essere stato clonato, sia nel topo che nell'uomo, nel 1993 da Yasuda e collaboratori e venne definito come OP1. Il recettore κ , clonato per la prima volta nel ratto l'anno seguente, come OP2 ed infine il recettore μ , ultimo per quale fu descritta la clonazione molecolare, come OP3.

Nel 2000 è stata approvata un'ulteriore nomenclatura, che ha permesso di rinominare i recettori μ come MOP (o MOR), i δ come DOP (o DOR) ed infine i κ come KOP (o KOR).

Una volta che tutti i recettori oppioidi umani furono clonati ed estensivamente caratterizzati, è stato possibile appurare che essi appartengono alla super-famiglia dei recettori di membrana accoppiati a proteine G, caratterizzati da 7 domini transmembrana (TM) orientati perpendicolarmente al piano della membrana, una estremità N-terminale extracellulare sulla quale sono presenti due o più siti di glicosilazione, una estremità C-terminale intracellulare sulla quale sono presenti siti di palmitoilazione e fosforilazione, tre *loop* di connessione extracellulari caratterizzati da un ponte disolfuro tra la prima e seconda ansa, ed infine tre *loop* intracellulari caratterizzati da una specifica sequenza comune, definita DRY, sulla seconda ansa.¹⁵¹

La loro sequenza amminoacidica presenta un 30% di omologia con gli altri recettori metabotropici GPCRs di membrana quali ad esempio gli adrenergici e muscarinici, mentre la comparazione delle sequenze amminoacidiche tra i MOP, DOP e KOP rivela un'omologia di sequenza pari al 65-70%. In particolare, il maggiore grado di omologia si registra, a livello dei 7 domini TM (73-76%) che contengono probabilmente una tasca di interazione comune per i ligandi oppioidi, a livello dei *loops* intracellulari (63-66%) e della piccola porzione C-terminale vicino al settimo dominio TM. La minore omologia invece si riscontra, nel secondo e terzo *loop* extracellulare, probabilmente responsabili delle caratteristiche di selettività delle diverse classi, e nelle porzioni N- e C-terminali, rispettivamente extra- ed intracellulare.

Il meccanismo di trasduzione del segnale, in seguito all'attivazione recettoriale, avviene per mezzo di proteine G_i/G_o , responsabili quindi degli eventi cellulari coinvolti nell'accoppiamento recettore-effettore. Sebbene la loro attivazione porti ad una serie di effetti cellulari differenti, dipendenti dal tipo recettoriale coinvolto, quando il ligando agonista si lega al proprio sito evoca una modificazione conformazionale del recettore e la subunità G_α , che prima legava GDP, passa allo stato attivato come G_α -GTP, dissociandosi dal dimero $G_{\beta\gamma}$.

La subunità G_{α} -GTP, che intercetta classicamente l'effettore di tipo enzimatico, diventa responsabile della modulazione in senso inibitorio della cascata della proteina enzimatica Adenilato Ciclasi, che porta quindi ad una conseguente diminuzione dei livelli intracellulari del II messaggero cAMP. Ciò provoca un'ipofunzionalità della PKA (protein-chinasi AMP ciclico dipendente), responsabile di meccanismi di fosforilazione a cascata che modulano indirettamente l'attività di canali ionici, producendo quindi nella cellula una riduzione della corrente di voltaggio dipendente che causa l'iperpolarizzazione, incrementando così la soglia di eccitabilità cellulare. Chiaramente, conseguenza di tali eventi è dunque una forte inibizione del *firing* neuronale, in seguito alla depressione del rilascio neurotrasmettitoriale, che porta pertanto ad una interdizione della trasmissione degli stimoli nocicettivi.¹⁶⁶⁻¹⁶⁷

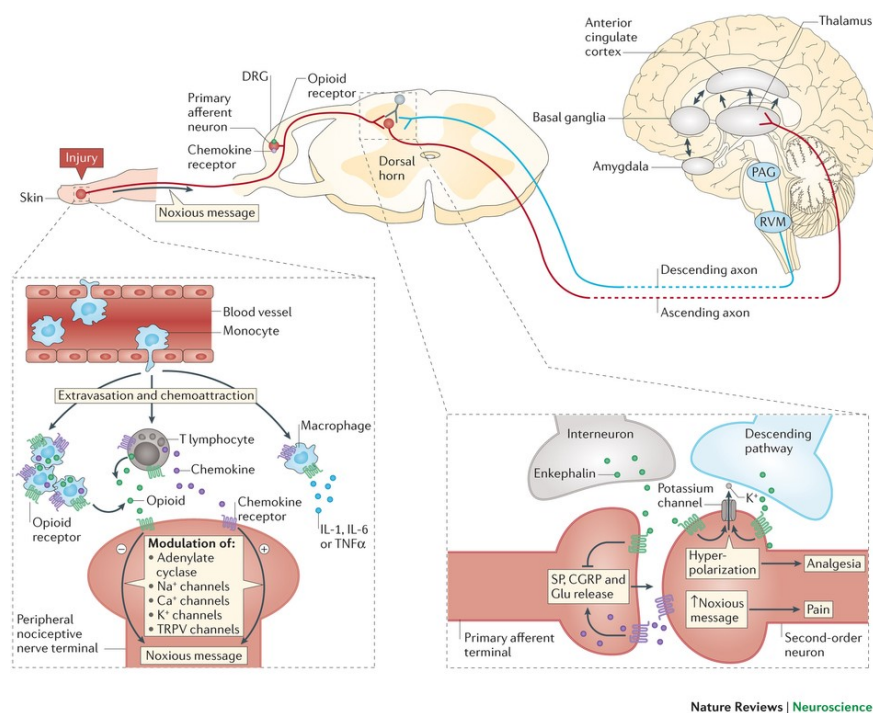


Fig. 3.6: Modulazione del messaggio nocicettivo attraverso l'attivazione dei recettori oppioidi e la via di segnalazione mediata dalle chemochine. Dopo una lesione tissutale o un'infezione cronica, le cellule immunitarie (macrofagi e linfociti T) migrano dai vasi sanguigni ai tessuti infiammati tramite diapedesi, processo che controllato dalle chemochine (cerchi in viola). Le cellule immunitarie rilasciano citochine pro-infiammatorie, il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-alfa-), interleuchina-1 (IL-1) e IL-6 e chemochine, in grado di modulare in maniera positiva lo stimolo nocicettivo. Successivamente, peptidi oppioidi (cerchi in verde), secreti dalle cellule immunitarie attivate, promuovono un importante effetto antinocicettivo. Durante il dolore, le chemochine sono secrete dal terminale afferente primario dove agiscono in modo autocrino e paracrino per indurre il rilascio di calcitonina, sostanza P (SP) e glutammato (Glu), inoltre partecipano anche all'attivazione dei neuroni di secondo ordine nel midollo spinale dorsale. Gli interneuroni attivati rilasciano oppioidi endogeni, che mediano l'analgesia inibendo SP e Glu rilasciati dai terminali afferenti primari e dalla iperpolarizzazione (tramite efflusso di K⁺) dei neuroni di secondo ordine. Il messaggio nocicettivo ascendente viene poi integrato in aree cerebrali superiori (come talamo, corteccia anteriore, gangli basali e amigdala). Infine, l'attività coordinata di queste strutture centrali modula la segnalazione nocicettiva a livello della sinapsi tra i neuroni primari afferenti e neuroni di secondo ordine discendenti tramite il rilascio di oppioidi endogeni (in blu) dal nucleo periacqueduttale (PAG) e midollo rostrale ventromediale fino al corno dorsale. (Nature Reviews Neuroscience, 2015, 16, 69–78.)

L'iperpolarizzazione cellulare è altresì dovuta all'azione delle subunità $G_{\beta\gamma}$. Tale dimero infatti, che intercetta solitamente gli effettori canale, attiva un meccanismo molecolare che porta alla modulazione diretta di canali del K^+ e Ca^{2+} voltaggio-dipendenti, ed in particolare i recettori μ e δ aumentano la conduttanza al K^+ , mentre i recettori κ riducono anche le correnti entranti di Ca^{2+} .

Il legame del recettore con l'agonista pertanto, media, a livello presinaptico una inibizione dei canali per il Ca^{2+} di tipo N contribuendo quindi ad una ulteriore riduzione del rilascio di neurotrasmettitore, ed a livello postsinaptico l'apertura dei canali per il K^+ inducendo iperpolarizzazione delle membrane, ed inibizione della conduttanza al Ca^{2+} tramite i canali di tipo L voltaggio-dipendenti.¹⁶⁸

Naturalmente, una volta esplicita l'azione biologica, la subunità G_{α} -GTP viene idrolizzata a G_{α} -GDP e si riassocia alle altre subunità riformando il trimero iniziale, e facendo quindi tornare il recettore nella sua conformazione inattiva.

Diversi studi farmacologici, hanno mostrato buone evidenze circa l'esistenza di differenti sottotipi recettoriali, per ciascuno dei recettori oppioidi, come conseguenza della diversa sensibilità, mostrata verso agonisti ed antagonisti specifici. Nello specifico sono stati identificati:¹⁶⁹

- Tre sottoclassi per il κ diversificate in KOP 1, KOP 2, KOP 3;
- Due sottoclassi per il δ distinte in DOP 1, DOP 2;
- Tre sottoclassi per il μ classificate in MOP 1, MOP 2, MOP 3;

Tuttavia, attualmente, tali strutture non sono ancora state identificate a livello molecolare, essendo stati clonati solamente tre differenti cDNAs corrispondenti alle sequenze proteiche dei recettori MOP, DOP e KOP e non dei loro molteplici sottotipi. Sono state però postulate differenti ipotesi circa la loro natura e i potenziali meccanismi, considerandoli, come il risultato di modifiche post-traslazionali (varianti di spiazzamento) dei tipi noti di recettore, od ancora molteplici tipologie dei recettori classici accoppiati però a diversi sistemi di trasduzione del segnale.¹⁷⁰

Così come per altri sistemi recettoriali, è stata inoltre postulata, a tal proposito, la teoria della omo- ed eterodimerizzazione,¹⁷¹ secondo la quale l'associazione MOP-DOP rappresenta un sottotipo del recettore DOP e l'interazione KOP-DOP costituisce invece uno dei sottotipi del recettore KOP. A supporto di questa teoria è stato inoltre dimostrato che ligandi dimerici (come ad esempio analoghi dimerici della morfina o dell'encefalina) hanno un'affinità maggiore per i recettori DOP e MOP rispetto ai monomeri, e mostrano anche una potenza maggiore in saggi in vitro quali MVD (*mouse Vas Deferens*) e gpI (*guinea pig Ileum*),¹⁷² due preparati farmacologici di elezione per la valutazione biologica di molecole oppioidi.

La clonazione dei geni codificanti per tali recettori, ha consentito di poter studiare individualmente, sul singolo tipo recettoriale, non solo il meccanismo di trasduzione del segnale, ma anche la specifica distribuzione anatomica, regolazione dell'espressione, selettività ai ligandi, funzione biologica e

profilo farmacologico. I recettori oppioidi presentano infatti delle differenze in termini di effetti prodotti, ma anche di effetti collaterali.

3.11 Recettori μ .

L'esistenza dei diversi sottotipi recettoriali MOP si deve agli studi di *binding* effettuati con il [³H]naloxone e la [³H]diidromorfina da Pasternak e collaboratori, i quali misero in evidenza l'esistenza di due distinti siti di legame che designarono come μ_1 e μ_2 .

Oggi sappiamo che i recettori di questa classe, che possiedono la più elevata affinità per la morfina, sono proprio i μ_1 , e quindi la profonda analgesia mediata dai recettori oppioidi MOP è dovuta all'attivazione di questo specifico sottotipo recettoriale. Mediante tecniche autoradiografiche con vari radioligandi marcati, è stato possibile appurare la vasta distribuzione del sottotipo recettoriale MOP in varie zone del SNC e SNP.¹²⁸

Elevate quantità di recettori MOR sono state trovate infatti a livello della PAG, nel nucleo del rafe magno, dove sono localizzati su interneuroni GABAergici la cui attivazione inibisce il rilascio di GABA dagli interneuroni stessi, ed ovviamente negli strati superficiali del corno dorsale del midollo spinale, rendendo quindi perfettamente chiaro il loro potente coinvolgimento nei meccanismi di analgesia sia spinale che, in particolar modo, sovrspinale.¹⁵¹

Tuttavia, una elevata espressione di MOP, è stata riscontrata anche in moltissime altre aree del Sistema Nervoso Centrale e Periferico non direttamente coinvolte nei meccanismi di trasduzione e trasmissione dell'informazione dolorifica, giustificando pertanto lo spettro di effetti collaterali indotti dalla loro attivazione.

In particolar modo, una ampia distribuzione di tali strutture recettoriali sono state rinvenute in differenti formazioni quali il nucleo del tratto solitario, nucleo commissurale, nucleo ambiguo, locus coeruleus, nuclei ipotalamici dove pertanto, i recettori MOP, pare siano coinvolti in diversi processi fisio-patologici quali l'inibizione della tosse, della secrezione e motilità gastrica ed eventi di ipotensione ortostatica.

Importante presenza di recettori μ si registra anche a livello di differenti aree coinvolte nei meccanismi endocrini quali l'ipotalamo, l'infundibolo ipotalamico, l'eminenza mediana, ed ovviamente l'adenoipofisi nella quale in particolare, i μ_1 sono coinvolti nella modulazione del rilascio di prolattina, mentre la sottopopolazione μ_2 , pare sia implicata nella modulazione del rilascio dell'ormone della crescita (GH). Anche la neuroipofisi è interessata da meccanismi modulatori mediati da tale famiglia recettoriale, coinvolti infatti nell'inibizione della secrezione di vasopressina (ADH ormone antidiuretico).

La presenza inoltre di tale recettore nel nucleo di Edinger-Westphal, nel mesencefalo e nel collicolo

superiore determina, in collaborazione con i DOP, condizioni di miosi; così come l'espressione a livello dell'area postrema giustifica l'induzione di nausea e vomito, in seguito all'attivazione di entrambe le classi recettoriali. Gli effetti di notevole rigidità muscolare verificati in seguito alla somministrazione di ligandi agonisti, sono stati correlati alla importante presenza dei recettori MOP a livello del nucleo caudato; l'elevata espressione invece di tutte le tre classi recettoriali, in differenti aree del sistema limbico quali l'amigdala, l'ippocampo e la corteccia cerebrale, rende evidente il loro coinvolgimento nelle funzioni comportamentali, dell'affettività e della memoria. Sicuramente, tra tutti gli effetti collaterali causati dall'attivazione recettoriale MOP, nei vari distretti anatomici in cui esso è presente, il più pericoloso ed allarmante è la condizione di depressione respiratoria, indotta a livello del centro pneumotassico bulbo-pontino, del nucleo del tratto solitario dove sono presenti i centri respiratori ventrale e dorsale, e del nucleo motore dorsale del vago. Recenti studi, suggeriscono però che tali effetti respiratori, così come i fenomeni di cataplessia ed acinesia, siano mediati da un solo sottotipo recettoriale e cioè il μ_2 , facendo fortunatamente assumere al sottotipo μ_1 , decisamente più coinvolto nella funzione analgesica, un ruolo marginale in tali gravissimi effetti collaterali.¹⁵¹ La morfina, sebbene presenti una notevole affinità per tutti e tre i sottotipi recettoriali, rappresenta il ligando agonista principale del recettore MOP, giustificando pertanto l'elevata correlazione tra la potenza del suo effetto analgesico e l'affinità per tale famiglia recettoriale. Studi effettuati su topi *Knockout* per il μ -R, nella quale quindi si è avuta una delezione del gene che codifica per questa specifica proteina recettoriale, presentano una importante insensibilità alla morfina, confermando quindi che i maggiori effetti farmacologici osservati dopo la sua somministrazione, derivano dall'interazione, in particolar modo, con questa specifica classe recettoriale.¹⁷³ Chiaramente, mediante differenti studi di correlazione struttura-attività effettuati sulla molecola della morfina, sono stati identificati molteplici composti selettivi per i recettori MOP (**Fig.3.7**).

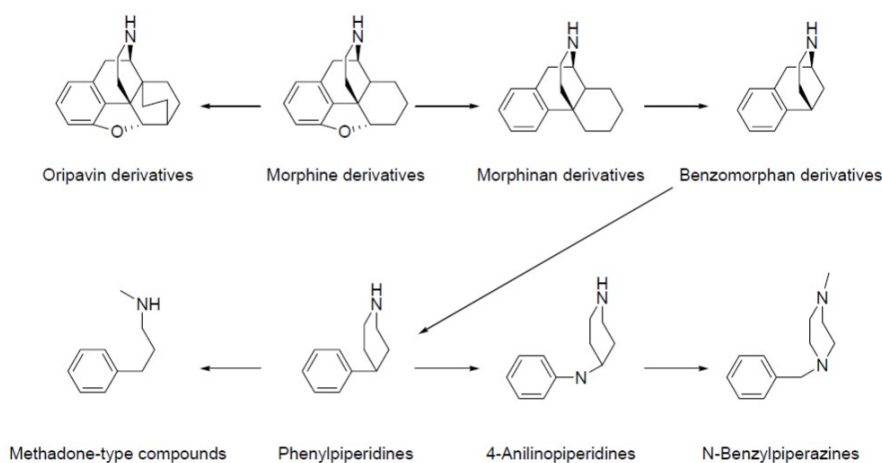


Fig. 3.7: Studi di semplificazione molecolare sulla Morfina per ottenere ligandi μ sempre più selettivi.

Tutti gli alcaloidi estratti dall'oppio ad esempio, così come la maggior parte dei loro derivati sintetici si comportano da agonisti particolarmente selettivi per i recettori μ , permettendo quindi di identificare quelle caratteristiche strutturali essenziali per la ricerca e progettazione di nuovi e potenti agonisti. Lo studio della sequenza amminoacidica di peptidi oppioidi endogeni quali la β -endorfina ed encefaline ha contribuito invece, allo sviluppo di ligandi, di natura peptidica, capaci di interagire selettivamente con tale popolazione recettoriale. Per quanto concerne invece i composti che presentano un profilo di antagonista, il naloxone ed il naltrexone, veri e propri farmaci salvavita utilizzati in clinica, vengono considerati antagonisti, con una selettività dalle 5 alle 10 volte superiore, per i recettori MOP, sebbene in realtà la preferenza per tali strutture non sia poi così netta. Dalle analisi strutturali su questi due rappresentanti risulta evidente che la semplice sostituzione del gruppo N-metilico della morfina con un sostituito a maggior ingombro sterico, possa far comportare la molecola da agonista a potente antagonista oppioide.¹⁷³

3.12 Recettori δ .

Nel 1977 Kosterlitz e collaboratori identificarono l'ultimo dei recettori oppioidi attualmente noti, chiamandolo appunto δ (delta), basandosi sulla maggiore potenza esibita dalle due encefaline, rispetto alla morfina, nell'inibire la liberazione neurotrasmettitoriale in seguito alle contrazioni indotte elettricamente sul vaso deferente del topo. Differenti studi di *binding* effettuati con radioligandi, in tessuti di cervello di roditore e nel vaso deferente elettricamente stimolati, hanno fornito prove dell'esistenza di due diversi sottotipi recettoriali definiti come δ_1 e δ_2 ,¹⁷⁴ il cui significato funzionale non è ancora stato del tutto chiarito.

L'utilizzo di tecniche autoradiografiche con vari ligandi triziati e radioiodinati, ha permesso di studiare la distribuzione tissutale, di tale sottoclasse del recettore oppioide, identificandolo a vari livelli nel SNC. Tecniche di ibridazione *in situ* ed immunoistochimiche, effettuate in seguito alla clonazione delle proteine recettoriali, hanno permesso inoltre di visualizzare le cellule preposte alla sintesi di tali recettori, migliorando pertanto la risoluzione anche a livello cellulare.

Nel SNC, il recettore oppioide δ , presenta tuttavia una distribuzione più limitata rispetto agli altri appartenenti a questa classe, con una particolare densità a livello del bulbo olfattivo, del nucleo caudato, del putamen, e del nucleo accumbens ed in misura minore nel talamo, ipotalamo e bulbo in generale. È chiaro che la sua presenza sia predominante in strutture cerebrali evolutivamente più recenti, suggerendo infatti che tale recettore potrebbe aver raggiunto il suo pieno sviluppo, dal punto di vista evolutivo, più tardi rispetto agli altri della famiglia.¹⁵¹

I recettori δ oppioidi sono coinvolti in molteplici funzioni fisiologiche, svolgendo un ruolo nel coordinamento dei movimenti incrementando l'attività motoria, nelle funzioni immunitarie in accordo con l'espressione di tali proteine recettoriali in differenti cellule del sistema immunitario, nella funzione cardiovascolare dove risulta una loro partecipazione all'effetto ipotensivo di natura centrale. La stimolazione del recettore DOP, seppur in misura minore rispetto ai MOP, produce anche depressione respiratoria, portando ad una riduzione della frequenza del respiro con un prolungamento del tempo di espirazione; e sembrano inoltre coinvolti nella regolazione della motilità intestinale determinando una inibizione del transito gastroenterico in seguito all'attivazione dei recettori sia spinali che sovraspinali. Recentemente, è stato inoltre proposto, che agonisti selettivi per il recettore DOP potrebbero essere impiegati quali potenziali farmaci ad azione ansiolitica ed antidepressiva con un meccanismo d'azione ed un profilo farmacologico totalmente diverso dalle molecole attualmente impiegate per la terapia di tali patologie.¹⁷⁵

Chiaramente, ultimo, ma non meno importante, è il ruolo preminente, della famiglia recettoriale δ , nell'azione antinocicettiva, congiuntamente agli altri sottotipi recettoriali.

E' stato infatti osservato, che i recettori δ spinali, mediante l'attivazione da parte di agonisti selettivi,

sono in grado di mediare una inibizione del rilascio di neurotrasmettitori eccitatori quali la sostanza P od il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP), dai terminali delle fibre nocicettive afferenti del I° ordine a livello del corno dorsale del MS. Nella riduzione degli stimoli nocicettivi inoltre, non si può escludere il coinvolgimento di tali recettori, se pur marginale rispetto ai MOP, anche a livello dei siti sovraspinali, come dimostrato dai leggeri effetti analgesici, registrati in differenti esperimenti effettuati su topi *Knockout* per il recettore MOP, in seguito a somministrazione intracerebroventricolare (i.c.v) di agonisti δ selettivi.

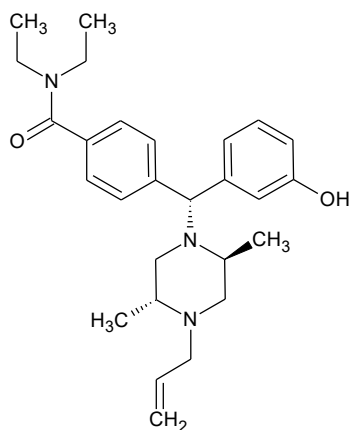
Le due encefaline, [Leu⁵]encefalina e [Met⁵]encefalina, primi peptidi endogeni ad attività oppioide ad essere stati identificati, vengono considerati i ligandi naturali del recettore oppioide DOP. In realtà, tramite differenti studi farmacologici sia in vitro che in vivo, effettuati da diversi gruppi di ricerca, è stato dimostrato che tali peptidi sono solo leggermente selettivi per la popolazione δ , mostrando infatti buone caratteristiche di affinità anche per i recettori MOP.

La [Leu⁵]encefalina, rispetto al correlato composto contenente la metionina, mostra una maggiore selettività per il recettore DOP ed una minore affinità per il MOP, entrambe invece presentano una affinità irrilevante per il recettore κ . Naturalmente, il profilo presentato da questi due ligandi endogeni, il cui utilizzo quali strumenti farmacologici e potenziali farmaci è notevolmente limitato a causa della rapida degradazione enzimatica, ridotto assorbimento ed incapacità di oltrepassare la barriera ematoencefalica (BEE), ha incoraggiato lo sviluppo di analoghi selettivi mediante modificazioni dello scheletro amminoacidico.

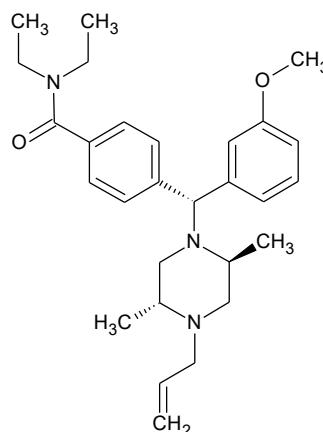
Tramite differenti strategie sintetiche è stato possibile pertanto ottenere numerosi composti, anche notevolmente più selettivi e potenti dei rispettivi ligandi endogeni, come ad esempio il DADLE cioè la [D-Ala²,D-Leu⁵]encefalina, il DSLET [D-Ser²,Leu⁵]encefalina, ed il peptide ciclico DPDPE [D-Pen²,D-Pen⁵]encefalina.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

La limitazione relativa però alla loro incapacità di attraversare la BEE, ha certamente stimolato la ricerca allo sviluppo di agonisti δ selettivi non peptidici, che potessero pertanto chiarire le funzioni fisiopatologiche in vivo, di tale famiglia recettoriale.

Il primo di questi composti, il BW373U86, fu messo a punto nel 1993, costituendo un *lead compound* per lo sviluppo di agonisti DOP non peptidici ad elevata affinità per il recettore, il quale ha portato, negli anni seguenti, a differenti molecole quale certamente l'SNC-80, etere metilico di uno degli enantiomeri del precedente composto, il cui profilo *in vivo* risulta essere notevolmente migliore, producendo un effetto analgesico dose e tempo dipendente e minori effetti convulsivanti.¹⁵¹



BW373U86 agonista selettivo per il recettore δ , è un potente analgesico e antidepressivo su modelli animali.



SNC-80 è il primo ligando non peptidico altamente selettivo per il recettore δ , ha effetti analgesici, antidepressivi e ansiolitici su modelli animali. Il suo uso è limitato in quanto provoca convulsioni a dosi elevate.

Per quanto concerne invece le molecole in grado di legare il recettore ma prive di attività intrinseca, rivestono una particolare importanza il naltrindolo ed il correlato naltriben,¹⁷⁹⁻¹⁸⁰ antagonisti non peptidici specifici per il recettore DOP, in grado di oltrepassare efficacemente la BEE, a differenza dei derivati di natura peptidica caratterizzati da insoddisfacenti proprietà farmacocinetiche. Gli antagonisti selettivi del recettore δ , stanno assumendo significato farmacologico sempre più importante in seguito ai potenziali usi clinici mostrati come immunosoppressori e nel trattamento dell'abuso di cocaina.¹⁷⁹⁻¹⁸⁰

3.13 Recettori κ .

Esistono evidenze scientifiche dell'esistenza di tre diversi sottotipi recettoriali del recettore oppioide κ designati come κ_1 , κ_2 e κ_3 . Al fine di risolvere la complessità e la molteplicità degli effetti farmacologici mediati da tale famiglia recettoriale, nel 1982 Attali e collaboratori identificarono, inizialmente, due diversi sottotipi del recettore oppioide κ . Mediante studi di *binding* con differenti ligandi fu possibile appurare che composti di tipo arilacetammidico sono in grado di legare solo il sottotipo κ_1 , a differenza dei κ_2 che invece non mostrano affinità per tali agonisti. Diversi anni più tardi Pasternak e collaboratori, identificarono nel cervello di vitello un ulteriore sottotipo, definendolo come κ_3 con differente modalità di *binding*. Il profilo farmacologico di κ_2 e κ_3 , tuttavia, risulta essere attualmente poco definito a causa della mancanza di ligandi selettivi, pertanto gli effetti fisiologici innescati dalla loro attivazione non sono ancora stati ben chiariti.¹⁸¹

La differente distribuzione tissutale appurata mediante tecniche autoradiografiche, e la localizzazione cellulare osservata tramite tecniche di ibridazione *in situ* ed immunostochimiche, ha permesso di

spiegare il molteplice coinvolgimento dei recettori κ in alcune importanti funzioni fisiologiche.

Sebbene sia stata osservata una buona sovrapposizione tra le zone in cui si ha l'espressione degli RNAm (RNA messaggero) ed i siti di legame, una mancanza di correlazione è presente in peculiari zone cerebrali coinvolte nel controllo di molteplici funzioni biologiche.

A livello del nucleo della sostanza nera, della pars compatta della substantia nigra, e dell'area ventrale del tegumento peduncolare, è stata registrata una elevata densità di RNAm per il recettore, ma un quasi totale assenza di siti di legame. Tutto ciò sembra suggerire un possibile trasporto del recettore κ , sintetizzato nel soma di tali neuroni, a livello dei loro terminali presinaptici diretti ai sistemi dopaminergici nigro-striatale e mesolimbico, motivando pertanto gli effetti opposti che i recettori oppioidi mediano su tali sistemi.

Per quanto concerne la via extrapiramidale di controllo del movimento, è stato osservato che agonisti MOP e DOP aumentano notevolmente il rilascio nigro-striatale di dopamina incrementando pertanto i loro effetti sulla locomozione, al contrario degli agonisti κ che ne diminuiscono il rilascio attenuando gli effetti. Tale differenza d'azione è relativa al fatto che i recettori κ , presenti nei terminali presinaptici dei neuroni dopaminergici, inibiscono il rilascio di dopamina mediante una inibizione presinaptica diretta, mentre i recettori MOP, localizzati sulla membrana cellulare del soma di interneuroni GABAergici, mediano un potenziamento della trasmissione dopaminergica mediante un'iperpolarizzazione di questi ultimi.

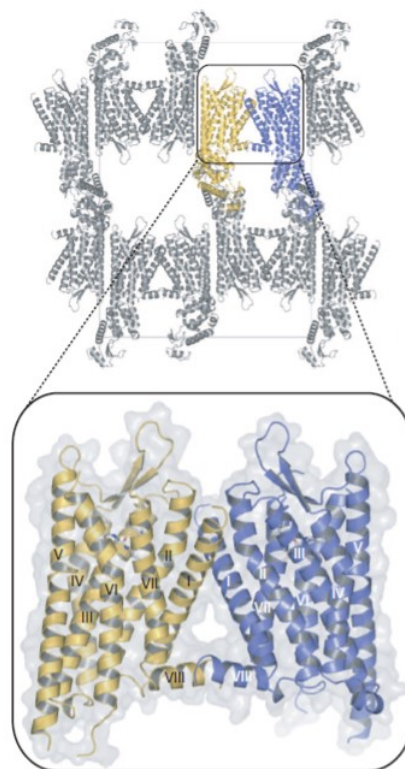


Fig. 3.8: Struttura cristallizzata del recettore κ , in evidenza si nota la peculiare struttura dimerica. (Nature, 2012, 10, 939)

I recettori κ , particolarmente espressi a livello dell'asse ipotalamo-ipofisario, sono altresì coinvolti in meccanismi di rilascio ormonale e neuroormonale. La loro localizzazione infatti a livello dell'area preottica mediana e del nucleo arcuato, giustifica l'influenza sul rilascio di differenti ormoni da parte dell'adenoipofisi quali l'aumento di prolattina, somatotropina, proopiomelanocortina, e corticosteroidi ed una diminuzione sul release dell'ormone luteinizzante (LH).

La presenza invece di tale popolazione recettoriale sui terminali presinaptici della neuroipofisi, suggerisce la connessione con la riduzione del rilascio dei due neuroormoni ossitocina e, in particolar modo, vasopressina, che pertanto spiega l'aumento della diuresi causata da agonisti κ .

Tale effetto diuretico, in grado dunque di ridurre la condizione di edema, ha peraltro permesso di osservare un effetto neuroprotettivo di agonisti κ , nel trattamento dei danni causati da ischemia cerebrale. L'attivazione dei recettori κ è anche accompagnata da un aumento dell'appetito e da ipotermia, sebbene sia meno spiccata di quella prodotta dal recettore MOP, ed inoltre la recente scoperta della sua espressione nelle cellule linfatiche, suggerisce un possibile coinvolgimento nel controllo della funzione immunitaria.

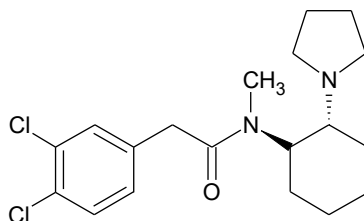
Naturalmente, al pari delle altre due tipologie recettoriali, i recettori oppioidi κ sono ampiamente connessi con i meccanismi di modulazione della percezione nocicettiva.

La loro presenza nel corno posteriore del midollo spinale, a livello delle lamine I e II superficiali e, seppur in misura minore negli strati più profondi IV e V, è coerente con l'importante ruolo svolto da tali recettori nel ricevere e processare le informazioni dolorifiche provenienti dai neuroni afferenti del I ordine. A livello cerebrale invece, strutture particolarmente ricche di recettori κ sono l'Area Grigia Periacqueduttale e differenti nuclei talamici ed ipotalamici, coinvolti nell'integrazione delle sensazioni nocicettive ascendenti e nei meccanismi di inibizione discendente, così come il sistema limbico e l'amigdala, relati agli stati affettivi ed emozionali che regolano dunque la consapevolezza del dolore. Nell'ambito delle proprietà analgesiche, aspetto notevolmente attenzionato in questa famiglia recettoriale, è stato certamente la mancanza di induzione dei gravi effetti collaterali tipici degli analgesici MOP come la depressione respiratoria e la costipazione; tuttavia, l'utilizzo di particolari agonisti κ a struttura benzomorfanica, ha portato a preoccupanti effetti collaterali di tipo sedativo, disforico e psicotomimetico nell'uomo.¹⁵¹

I ligandi agonisti endogeni del recettore oppioide κ appartengono alla famiglia delle dinorfine/neoendorfine, sintetizzate a partire dal precursore peptidico proencefalina B.

Tramite numerosi studi di correlazione struttura-attività eseguiti sulla sequenza amminoacidica di tali sostanze, è stato possibile ottenere analoghi peptidici, sia lineari che ciclici, correlati alla dinorfina quali agonisti di sintesi notevolmente più potenti e selettivi per il recettore.¹⁸²⁻¹⁸³ Per quanto concerne invece i ligandi agonisti non peptidi, oltre la ketociclaziocina ed il suo derivato etilico, sono stati

messi a punto una serie di derivati 6,7-benzomorfanici, quali la bremazocina, dotati di elevata affinità κ , ma selettività MOP/KOP estremamente limitata. Questo peculiare comportamento ha incoraggiato l'identificazione di una diversa classe di composti, a struttura arilacetamidica, affatto correlata alla morfina, dotati di una maggiore selettività per i recettori κ . Prototipo di questa serie di molecole fu l'U50488, con un rapporto di selettività KOP/MOP pari a 53 ed ampiamente studiato per la caratterizzazione dell'attività oppioide di tipo κ .¹⁸⁴



U50488 agonista κ , si comporta da analgesico, diuretico e antitussivo, inoltre presenta effetti anticolinergici.

Caratteristica particolarmente incoraggiante, osservata in oppioidi κ selettivi con sola azione periferica, è stata certamente la riduzione della condizione di iperalgesia tipica del dolore cronico, ad esempio di tipo infiammatorio, artrite o neuropatico, spronando alcuni ricercatori alla progettazione di un analgesico κ con una limitata capacità di oltrepassare la BEE, utile quindi nel trattamento di questa tipologia dolorifica e privo degli effetti collaterali precedentemente analizzati.¹⁸⁵

Nell'ambito dei ligandi antagonisti invece, sebbene ancora oggi non sia stato trovato nessun utilizzo clinico per composti dotati di affinità per il recettore κ ma incapaci di attivarlo, l'antagonista più selettivo sintetizzato per tale famiglia è certamente la nor-binaltorfimina il cui ruolo è stato determinante negli studi di caratterizzazione dei differenti sottotipi del recettore.¹⁸⁶

3.14 Ruolo dei recettori oppioidi nella modulazione dell'analgesia.

La distribuzione dei recettori oppioidi nel SNC spiega pertanto, il loro ruolo fisiologico e gli effetti farmacologici decretati dai ligandi agonisti. In generale si ritiene che l'analgesia soprasspinale sia mediata prevalentemente dai recettori di tipo MOP, con un ruolo marginale del sottotipo DOP, mentre l'analgesia spinale coinvolge tutti e tre i tipi recettoriali.¹⁸⁷⁻¹⁸⁹ I farmaci oppioidi dunque, producono i loro effetti analgesici attraverso la modulazione delle vie del dolore, sia ascendenti che discendenti, con importanti differenze nell'espressione delle diverse classi recettoriali.

Per quanto concerne le vie ascendenti, tramite tecniche di ibridazione *in situ* ed immunocitochimiche, è stato possibile mappare la precisa localizzazione degli RNAm e l'espressione delle relative strutture recettoriali, a vari livelli. Nei gangli spinali posti nelle radici dorsali del midollo spinale, sono espressi gli RNAm appartenenti a tutte e tre le classi recettoriali, sintomo del fatto che tutti e tre i recettori intervengono nella modulazione della trasmissione sensoriale primaria degli stimoli nocicettivi. In realtà, nelle cellule nervose di tali gangli spinali, si registra una differente localizzazione dei recettori, con una particolare espressione dei KOP nei neuroni di piccole e medie dimensioni, suggerendo un loro possibile coinvolgimento nella trasmissione di differenti tipologie di informazioni nocicettive.

Anche a livello delle corna dorsali del midollo spinale, sono espressi gli RNAm di tutti e tre i recettori oppioidi, al contrario invece delle strutture sovrasspinali dove si ha una netta predominanza di recettori MOP, ed in misura minore di KOP. Nelle vie discendenti invece, si evidenzia una considerevole espressione di recettori oppioidi, a livello sovrasspinale, ed in particolare nella Sostanza Grigia Periacqueduttale, nel nucleo del Rafe Magnus e nei nuclei reticolari con una netta prevalenza dei recettori MOP e DOP, ed a livello spinale, nello specifico nei terminali presinaptici dei neuroni delle lamine I e II delle corna dorsali, dove sono invece presenti i siti di legame dei recettori MOP, DOP e KOP ma non i rispettivi RNAm.¹⁵¹

Non sono invece stati rilevati siti di legame dei recettori KOP e DOP nei gangli spinali, mentre sono ampiamente distribuiti quelli dei recettori MOP. Alla luce di quanto detto, concrete evidenze farmacologiche indicano che l'analgesia è certamente mediata attraverso tutte e tre le classi di recettori oppioidi. L'attivazione dei recettori μ è, ad ogni modo, quella più efficace negli stimoli nocicettivi in quanto, contrariamente ai recettori δ e κ , non dipende nè dall'animale utilizzato, nè dalla via di somministrazione, nè tanto meno dal tipo di stimolo dolorifico applicato. I recettori μ , pertanto, mediano analgesia soprattutto a livello sovrasspinale, in particolar modo nella PAG ricca di tali strutture recettoriali, sebbene certamente, in collaborazione con i KOP e DOP, siano in grado di produrre una marcata analgesia anche a livello spinale.

Dalla precedente trattazione circa le specifiche caratteristiche peculiari dei vari recettori oppioidi, emerge chiaramente che l'attivazione del recettore MOP, sebbene sia in grado di produrre l'effetto

analgesico di maggiore entità rispetto ai DOP e KOP, è anche associato ai più forti e pericolosi effetti collaterali quali soprattutto la depressione respiratoria, euforia, sedazione, nausea, costipazione e dipendenza fisica.

Con l'utilizzo prolungato di analgesici oppioidi infatti, si osserva la comparsa di ulteriori effetti collaterali ancor più gravi, quali per l'appunto la dipendenza fisica e la tolleranza all'effetto analgesico, dovuti a meccanismi omeostatici adattativi che danno origine, a una sindrome d'astinenza quando il farmaco viene bruscamente interrotto, e a fenomeni di "*addiction*" ed abuso.¹⁹⁰⁻¹⁹⁴

Per quanto concerne il fenomeno della dipendenza fisica, sono stati osservati, per i diversi ligandi oppioidi, effetti opposti, trovando come plausibile spiegazione, al pari della via nigro-striatale precedentemente analizzata, la differente distribuzione dei recettori per gli oppioidi a livello del sistema dopaminergico-mesolimbico. È noto infatti che agonisti MOP e DOP aumentino il desiderio di autosomministrazione, mentre gli agonisti KOP hanno un effetto opposto.

Tali differenze comportamentali sono da attribuire, come per l'appunto a livello del sistema extrapiramidale, alla mancanza di correlazione trovata tra l'espressione del RNAm e la localizzazione dei siti di legame del recettore κ .

A livello del soma dei neuroni appartenenti all'area ventrale tegumentale, si registra infatti una elevatissima espressione di RNAm per il sottotipo κ ma una quasi totale assenza di siti di legame, che sembrano invece essere particolarmente presenti a livello dei loro terminali presinaptici, giustificando pertanto un possibile trasporto assonale. I recettori κ , presenti in tali terminazioni dopaminergiche determinano una inibizione presinaptica diretta sul rilascio mesolimbico di dopamina a livello del nucleo accumbens, motivando così il loro effetto negativo sul rilascio.

Al contrario invece i MOP e DOP, sono localizzati sulla membrana cellulare del soma di interneuroni GABAergici determinano una iperpolarizzazione di quest'ultimi, e portando quindi, in maniera indiretta, al notevole aumento del tono dopaminergico nel nucleo accumbens.¹⁵¹

Il fenomeno della tolleranza, che limita grandemente l'efficacia di questa classe di molecole per il trattamento del dolore cronico, si instaura in seguito all'utilizzo continuato del farmaco, portando quindi ad una notevole riduzione dell'effetto analgesico e alla necessità di aumentare progressivamente la dose per poter ottenere il medesimo profilo farmacologico.¹⁹⁰⁻¹⁹⁴

Le basi biologico-molecolari di tale comportamento, sebbene non ancora del tutto delineate, suggeriscono un possibile evento di desensibilizzazione della struttura recettoriale.

Alcuni studi suggeriscono infatti che, una continua stimolazione delle proteine recettoriali, implichi una loro fosforilazione da parte di specifiche chinasi cellulari accoppiate a proteine G, il cui successivo legame con la proteina β -arrestina ne determina l'internalizzazione e quindi l'incapacità di rispondere ai ligandi.¹⁹⁵

Altre evidenze sperimentali coinvolgono invece, come meccanismo di desensibilizzazione recettoriale, il disaccoppiamento di tale strutture dalle rispettive proteine G, interrompendo pertanto la comunicazione con il sistema di trasduzione intracellulare.¹⁹⁵

In realtà, è stato però analizzato, che l'antagonista oppioide non selettivo naloxone, è in grado di accelerare la comparsa dei sintomi dell'astinenza, nei soggetti che presentano tolleranza. Questa osservazione, suggerisce quindi che i recettori per gli oppioidi, anche nelle condizioni di tolleranza, continuano a funzionare, giustificando pertanto come, tale fenomeno, potrebbe essere in realtà il risultato di una risposta compensatoria che si oppone agli effetti degli oppioidi e riporta il sistema al suo stato omeostatico. Sulla base di questa ampia trattazione circa i meccanismi del sistema analgesico oppioide, nel particolare ambito clinico del trattamento del dolore di tipo neurogeno, recenti studi, effettuati in differenti modelli animali, iniziano ad evidenziare dati incoraggianti riguardo il potenziale utilizzo di farmaci oppioidi, sebbene sia sempre stato generalmente accettato che tali farmaci siano meno efficaci nel trattamento del dolore neuropatico rispetto a quello di origine infiammatoria.¹⁹⁵

Mediante questa serie di studi infatti, è stato possibile appurare come, una lesione nervosa periferica, sia sempre associata ad una importante perdita dei recettori MOP (μ) per gli oppioidi, proprio a livello dei gangli delle radici dorsali.¹⁹⁶⁻¹⁹⁹

Accanto a questa *down-regulation* oppioide, si osserva inoltre, sempre nelle radici dei gangli dorsali, una *up-regulation* della sintesi sia dell'mRNA codificante per la colecistochinina (CCK), che presenta proprietà di antagonista oppioidi. Un tale comportamento quindi porta potenzialmente, ad un'ulteriore riduzione dell'effetto anti-nocicettivo mediato dal sistema oppioide, e ad un aumento dell'inibizione di quest'ultimo da parte dell'ormone espresso, contribuendo pertanto alla riduzione della potenza e dell'efficacia di tali sostanze nel trattamento del dolore neuropatico. Tale ipotesi è stata supportata da un recente studio in cui si è visto che la potenza della morfina aumenta notevolmente, in differenti modelli di dolore neuropatico, se somministrata insieme ad un'antagonista del recettore CCKB. Questo, potrebbe certamente spiegare l'aumentata efficacia registrata con la somministrazione di ligandi oppioidi in questa particolare condizione dolorifica, supportando pertanto coloro che propongono l'utilizzo della terapia con tali farmaci per il trattamento del dolore neuropatico. Gli analgesici oppioidi, compreso il tramadolo, sono riconosciuti come utili agenti per la gestione delle fasi più acute del dolore cronico di tipo neuropatico.¹⁹⁹

MECCANISMI EPIGENETICI COINVOLTI NEL DOLORE

4.1 Meccanismi epigenetici coinvolti nel dolore cronico.

Sebbene nel corso di quest'ultimo decennio siano stati fatti straordinari progressi circa la comprensione dei meccanismi alla base del dolore cronico di tipo neuropatico, tale condizione rimane ancora oggi, in un'area clinica notevolmente carente. Considerato in origine, come una disfunzione di tipo neurofisiologica, caratterizzata da una eccessiva attività neuronale in specifici *pathway*, il dolore neurogeno è attualmente, grazie ai recenti studi effettuati, sempre più discusso in termini di modificazioni della plasticità neuronale in seguito a meccanismi di alterazione dell'espressione genica.²⁰⁰⁻²⁰¹ Sono ormai numerose infatti, le evidenze che l'espressione genica non è determinata unicamente dal codice genetico, ma anche da una molteplicità di fenomeni definiti epigenetici.²⁰²

Per epigenetica si intende qualunque attività di regolazione dei geni, tramite processi chimici che non interferiscono direttamente sul DNA, ma possono modificarne ugualmente il fenotipo. L'epigenetica, dunque, si riferisce ai cambiamenti nei meccanismi di espressione genica i quali, sebbene non alterino la sequenza di DNA, provocano una serie di alterazioni funzionali della morfologia e dell'attività cellulare.²⁰³ Una serie di attuali evidenze sperimentali, hanno inoltre dimostrato che differenti modificazioni epigenetiche possono verificarsi, a vari livelli, nelle regioni spinali e cerebrali che svolgono un ruolo chiave nelle condizioni di dolore cronico.²⁰⁴ Questi meccanismi, pare infatti siano in grado di determinare una vasta gamma di alterazioni, quali modificazione dell'espressione delle differenti famiglie recettoriali a livello delle terminazioni sinaptiche dei vari neuroni posizionati nel corno dorsale del midollo spinale, così come in differenti regioni sovraspinali quali la PAG ed il nucleo del rafe magnus, promuovendo pertanto lo sviluppo di sintomi positivi come l'iperalgisia, l'allodinia ed altri deficit sensoriali tipici nel dolore neuropatico.²⁰⁵ E' ormai riconosciuto infatti, che il dolore neuropatico promuova un gran numero di adattamenti persistenti sia a livello cellulare che molecolare, permettendo al danno nervoso di suscitare nelle cellule una serie di cambiamenti che contribuiscono allo sviluppo del dolore cronico e dei sintomi ad esso associato.²⁰⁶ Differenti prove sperimentali sostengono che tali cambiamenti siano in grado di indurre pesanti alterazioni nella struttura della cromatina, che portano pertanto a modificazioni dell'espressione genica e della funzione neuronale. Negli ultimi anni è stato dimostrato che l'attività genica viene influenzata da proteine che interagiscono con il DNA nell'assemblaggio della cromatina, da enzimi capaci di modificare tali proteine e infine dall'RNA.

I due principali meccanismi, spesso correlati tra loro, coinvolti nella regolazione epigenetica dei geni, prevedono:

- Il rimodellamento della struttura della cromatina mediante modifiche covalenti a livello di peculiari proteine definite istoni;
- La metilazione del DNA in posizione 5 dell'anello pirimidinico della citosina;

Per quanto concerne il primo di tali meccanismi, la famiglia enzimatica dell'istone deacetilasi (HDAC), gioca un ruolo sostanziale nella regolazione dell'espressione genica, pertanto la profonda conoscenza delle sue funzioni biologiche risulta essere indispensabile per poter comprendere pienamente i meccanismi che stanno alla base dell'epigenetica.²⁰⁷

4.2 Enzima Istone Acetilasi (HAT) ed Istone Deacetilasi (HDAC).

Le proteine istoniche sono piccole strutture protidiche altamente basiche, caratterizzate da un dominio centrale apolare provvisto di una struttura globulare, e da due regioni C- ed N-terminali flessibili, rispettivamente localizzate all'interno e all'esterno del nucleosoma, contenenti la maggiore quantità di amminoacidi basici tra cui, le più abbondanti, lisina ed arginina.²⁰⁸ Chiaramente la presenza di tali amminoacidi sulle code istoniche, permette l'instaurarsi di interazioni elettrostatiche tra questi ed i gruppi fosfato, carichi negativamente, presenti nelle strutture zucchero-fosfato del DNA.

Le proteine istoniche, ed in particolar modo H3 e H4, rappresentano un target molecolare per differenti modifiche post-traduzionali in specifici amminoacidi della sequenza primaria quali:

- L'acetilazione delle Lys;
- La metilazione delle Lys e Arg;
- La fosforilazione delle Ser;
- L'ubiquitinazione delle Lys;²⁰⁹

Tra le differenti modificazioni post-traduzionali appena citate, l'acetilazione sembra essere quella di maggiore interesse nei meccanismi di regolazione dell'espressione genica.

Lo stato di acetilazione degli istoni è controllato dall'attività di due famiglie di enzimi: le istone acetiltransferasi (HAT), recentemente rinominata KAT lisina(K) acetil trasferasi, e le istone deacetilasi (HDAC), i cui substrati preferenziali sono i gruppi ϵ -amminici dei residui di lisina delle code N-terminali, ed in modo particolare Lys9, Lys14 sull'istone H3, e Lys5, Lys8, Lys12, Lys16 sull'istone H4.²¹⁰

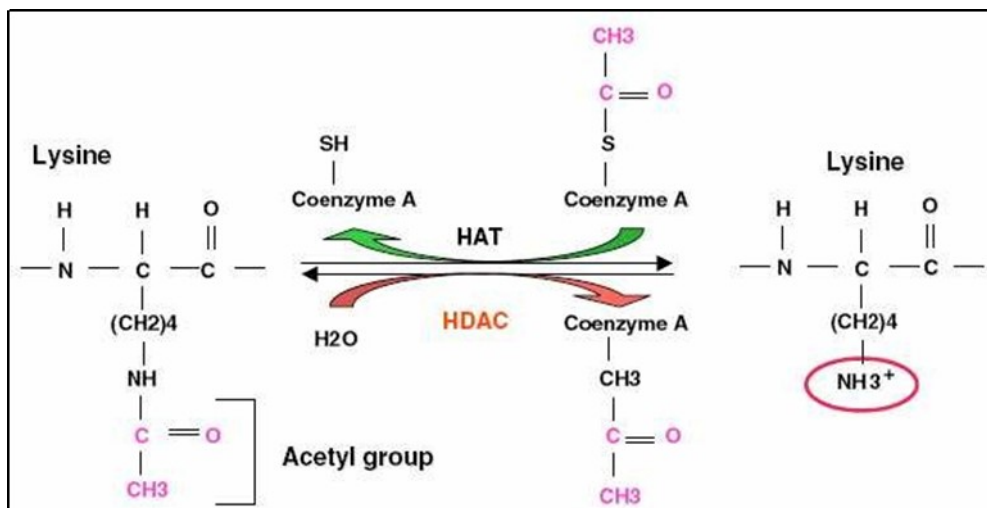


Fig. 4.1: Lo stato acetilato del residuo di lisina è governato dall'attività di HAT e di HDAC.

Tali proteine enzimatiche dunque, costituiscono due importanti modulatori epigenetici che giocano un ruolo chiave nella regolazione genica, mediando lo stato di acetilazione delle proteine istoniche a

livello della struttura cromatinica, e promuovendo cambiamenti a lungo termine nell'espressione genica.²¹¹

Lo stato di iper- ed ipo- acetilazione della cromatina infatti, impatta sulla accessibilità, a specifiche sequenze di DNA, di peculiari fattori di trascrizione ed altri modulatori dell'espressione genica.²¹²

Gli enzimi HAT trasferiscono il gruppo acetilico dall'acetil-coenzima A (Co-A) all'azoto ϵ amminico dei residui di lisina critici, neutralizzando così la carica di tale aminoacido.

Questa modifica determina pertanto una variazione dello stato di impacchettamento del nucleosoma, in quanto determina una riduzione delle forze d'attrazione tra le cariche positive di tali aminoacidi basici e le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA, permettendo quindi l'instaurarsi di una conformazione aperta della cromatina così da favorire l'espressione genica.²¹³

Per contro invece, la deacetilazione del DNA portata avanti dalle HDACs, determina una ricondensazione della cromatina causando quindi una repressione della trascrizione genica.²⁰³

Appare dunque chiaro che, tali transizioni nella struttura cromatinica, ad opera di queste due classi enzimatiche, assuma un ruolo fondamentale nella regolazione epigenetica dell'espressione genica, in quanto la eterocromatina (cromatina condensata), essendo meno accessibile ai fattori di trascrizione, comporta una repressione della trascrizione a differenza della eucromatina (cromatina rilassata) che invece ne promuove il meccanismo.²¹⁴

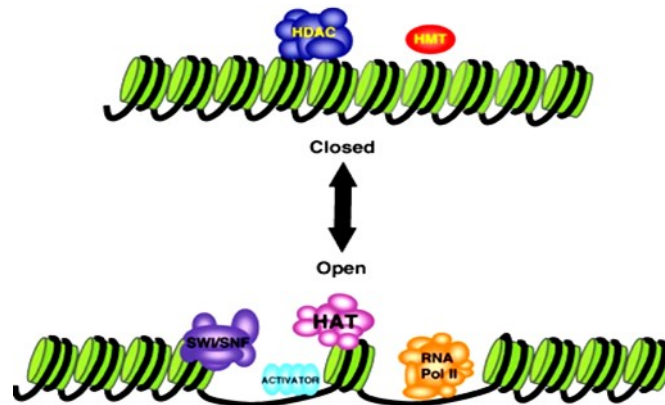


Fig. 4.2: La struttura della cromatina è modificata dinamicamente tra conformazione open e conformazione closed per consentire o negare l'accesso dei fattori di trascrizione ai geni. Il nucleosoma closed è gestito da modificazioni degli istoni quali deacetilazione e metilazione, che vengono effettuati da istone deacetilasi (HDAC) e istone metiltransferasi (HMTs). L'RNA polimerasi II (RNA Pol.II) accede ai geni mentre il nucleosoma è nella conformazione open. Lo stato nucleosoma open coinvolge le azioni coordinate di fattori di trascrizione (attivatori), complessi di rimodellamento ATP-dipendenti (SWI/SNF) e istone acetiltransferasi (HAT).

4.3 Classificazione HDAC.

Sono stati identificati 18 geni che codificano per altrettante isoforme enzimatiche di HDACs, diversificate in 4 classi in base alla grandezza, alla localizzazione cellulare e sub-cellulare, all'attività enzimatica, al numero di siti attivi e alle sequenze omologhe con l'enzima istone deacetilasi di lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Un'ulteriore classificazione dei rappresentanti appartenenti a queste quattro classi, differenzia gli enzimi HDACs in

- Zn-indipendenti/NAD⁺-dipendenti tutte le isoforme appartenenti alla classe III,
- Zn-dipendenti tutti i membri appartenenti alla classe I, alla classe II e l'unico rappresentante della classe IV.

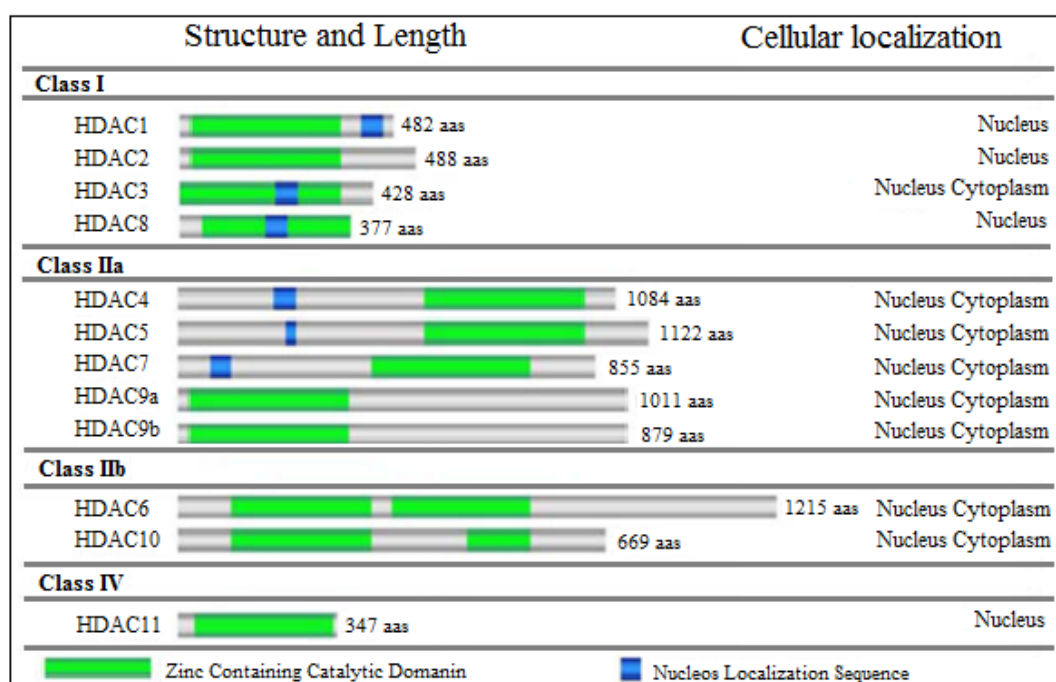


Fig. 4.3: Classificazione HDAC. (Lucio-Eterovic, 2008)

La Classe I comprende i sottotipi HDAC1, HDAC2, HDAC3 ed HDAC8, i primi ad essere stati identificati e per la quale è stata osservata una elevata omologia con la deacetilasi di lievito Rpd3.

Generalmente localizzate nel nucleo cellulare, ad eccezione di HDAC3 che ha invece una localizzazione ubiquitaria, tali isoforme sono espresse in una grande varietà di linee cellulari e tessuti.

Gli enzimi HDAC1, 2 e 3 sono associati a vari complessi nucleari multi-proteici quali rispettivamente Sin3, NuRD e/o CoREST per HDAC1 e HDAC2 e SMRT per HDAC3, i quali ricoprono un importante ruolo nell'impacchettamento della cromatina e dunque nella repressione trascrizionale; HDAC8 invece non è stato finora trovato in alcun complesso multi-proteico.²¹⁵

I due enzimi HDAC1 e HDAC2 sono stati considerati essenziali durante l'embriogenesi²¹⁶ e sono

importanti nella differenziazione delle cellule di Schwann,²¹⁷ ed inoltre si è visto che la carenza di HDAC1 è letale durante l'embriogenesi precoce,²¹⁸ la carenza di HDAC2, invece, porta alla letalità il 50% delle cavie vitali.²¹⁹

La Classe II è formata da HDAC4, 5, 6, 7, 9 e 10, a loro volta suddivisi in due sottoclassi: IIa (HDAC4, 5, 7, 9) e IIb (HDAC6 e 10) aventi tutte un dominio simile alla deacetilasi del lievito Hda1, e dimensioni due o tre volte maggiori rispetto alle specifiche isoforme appartenenti alla precedente classe. Si possono trovare sia nel citoplasma che nel nucleo, dove sono deputate principalmente a mediare la repressione della trascrizione dei geni correlati al differenziamento, e nella regolazione della proliferazione cellulare.

Come i membri della classe I, le HDAC di classe II agiscono in complessi multi-proteici, e sono sensibili all'azione di noti inibitori HDACi, come il SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid) e la Tricostatina A (TSA). Di particolare rilevanza in questa classe è l'isoforma HDAC6, il quale si trova maggiormente nel citoplasma cellulare, dove svolge la funzione di deacetilazione in molteplici strutture proteiche non istoniche quali ad esempio la α -tubulina e la proteina HSP90, potenziale modulatore del *folding* proteico.

La Classe III comprende invece sette isoforme enzimatiche denominate "sirtuine" (SIRT1-7), correlate alla proteina di repressione del lievito SIR2, per la loro elevata omologia nella sequenza primaria. Come precedentemente accennato, si tratta di strutture proteiche Zn-indipendenti/NAD⁺-dipendenti che richiedono NAD⁺ per la loro attività di regolazione dell'espressione genica, la quale avviene in risposta a cambiamenti dello stato ossido-riduttivo nella cellula; e che sono di fatto incapaci di interagire con i composti che inibiscono le prime due classi enzimatiche.²²⁰

La Classe IV è invece costituita da un unico rappresentante enzimatico cioè l'HDAC11, localizzato all'interno del nucleo cellulare ed espresso in tutti gli organismi eucariotici eccetto i funghi.

4.4 Inibitori HDAC (HDACi).

Gli enzimi HDACs suscitarono il primo interesse nell'ambito della ricerca clinica, quando fu appurato, per la prima, il loro coinvolgimento nei fenomeni di cancerogenesi.²²¹⁻²²² E' stato infatti oramai ampiamente dimostrato che condizioni di over-espressione degli enzimi HDACs, o una riduzione dell'attività di HATs, sono coinvolti nella proliferazione delle cellule tumorali.²²³ Alla luce di quanto detto, pertanto, gli enzimi HDACs costituiscono un fondamentale *target* per interventi terapeutici destinati ad invertire aberranti stati epigenetici associati al cancro.²²⁴ Negli ultimi dieci anni infatti, gli inibitori di tali proteine enzimatiche hanno ottenuto un notevole interesse come

potenziali agenti antitumorali, ed al momento i due HDACi approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) a tal proposito sono il Vorinostat (acido idrossamico suberoilamide, ZOLINZA®) e Romidepsin (depsipeptide, ISTODAX®), utilizzati rispettivamente per il trattamento del refrattario linfoma cutaneo delle cellule T (CTCL) e per il linfoma periferico di cellule T (PTCL).²²⁵⁻²²⁶

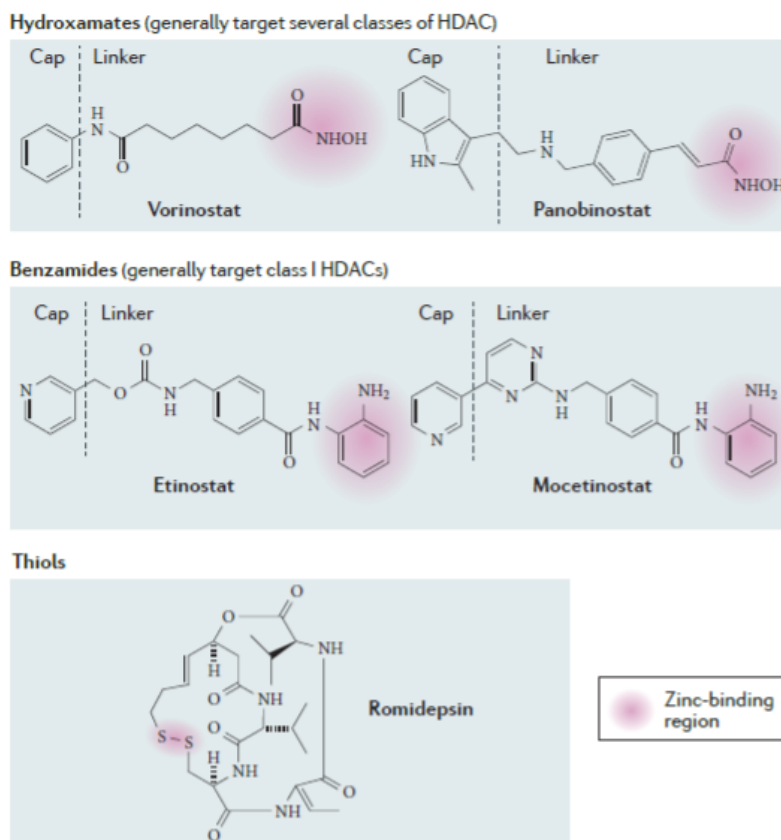


Fig. 4.4: In generale, il gruppo farmacoforico di HDAC è composto da tre regioni: la regione 'cap', responsabile della selettività degli HDACi; una porzione Zinc-binding che chela lo ione zinco nel sito attivo ed è necessaria per la funzione catalitica; ed una regione 'linker', che collega le due precedenti regioni. Storicamente, la maggior parte degli HDACi presentano una struttura idrossammica, tuttavia, altri gruppi sono in grado di interagire con la regione di Zinc-binding e vengono utilizzati per aumentare la specificità e selettività, tra cui i derivati benzenammidici, derivati tiolici, derivati sulfamidici, derivati chetonici e derivati tri-tiocarbonati. I derivati idrossammici (vorinostat e panobinostat), generalmente inibiscono più isoforme dell'HDAC, mentre i derivati benzenammidici (etinostat e mocetinostat) inibiscono generalmente HDAC della classe I. Infine, la regione del linker può essere modificata per aumentare la specificità, come l'aggiunta di un anello aromatico che è in grado di interagire con la tasca catalitica e conferisce selettività per le isoforme dell'HDAC appartenenti alla classe I e alla classe IIb.

In realtà l'elevata mole di studi sulle caratteristiche fisio-patologiche di tale famiglia enzimatica, effettuati in campo oncologico, ha messo in luce ulteriori risvolti in ambito terapeutico, suggerendo il loro possibile coinvolgimento con una vastissima gamma di condizioni patologiche.

Una serie di incoraggianti studi preclinici e clinici effettuati in questi ultimi anni, hanno infatti suggerito meccanismi di *up regulation* degli enzimi HDACs, alla base di differenti patologie ad esempio di origine infiammatoria ed immunitaria, quali la policitemia vera o la trombocitopenia

essenziale, od ancora l'artrite reumatoide, la sindrome di Rett e la sindrome Rubinstein-Taybi, il morbo di Huntington e la sclerosi multipla.²²⁷ Anche a livello del Sistema Nervoso, l'elevata iper-espressione di differenti isoforme di HDACs sembra essere ampiamente coinvolta in differenti patologie neurodegenerative quali il Parkinson e l'Alzheimer, così come nei processi cellulari fondamentali quali i meccanismi di plasticità neuronale.²²⁸ Un importante settore clinico nella quale sta attualmente emergendo sempre di più, l'interesse per lo studio degli enzimi HDACs ed il potenziale trattamento con i loro inibitori, è certamente la condizione di dolore cronico.²²⁹

E' stato infatti recentemente osservato che l'aumento dell'espressione di HDACs, registrate a livello delle lamine superficiali delle corna dorsali del midollo spinale, sia la chiave dei meccanismi di mantenimento della condizione dolorifica nel dolore cronico.²³⁰

Studi effettuati su differenti modelli animali di dolore neuropatico hanno infatti recentemente appurato che l'acetilazione istonica a livello del midollo spinale sia notevolmente implicata nei meccanismi di sensibilizzazione nocicettiva. Queste osservazioni pertanto, hanno condotto all'ipotesi che la modulazione dell'attività enzimatica coinvolta nella funzione cromatinica può impedire adattamenti nell'espressione di geni che contribuiscono alla sensitizzazione dolorifica.²⁰⁶

Attualmente, gli inibitori delle HDAC (HDACi), costituiscono un gruppo notevolmente eterogeneo di composti, sia di origine naturale che sintetica, che variano per la struttura, per l'attività biologica, per la specificità mostrata nei confronti delle varie isoforme, ma tutti certamente in grado di legare direttamente il sito attivo dell'enzima e bloccarne l'accesso al substrato, determinando così un aumento dello stato di acetilazione degli istoni. Ad oggi, è possibile classificare le molecole ad attività inibitrice nei confronti delle HDAC, in diversi gruppi in base alle differenti strutture chimiche, tra cui acidi grassi a corta catena, derivati dell'acido idrossammico, benzammidi, epossidi, peptidi ciclici, e composti ibridi.²³¹

Il SAHA, approvato nel 2006 dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) con il nome di ZOLINZA® (Merck) appartiene a tale classe, e sta attualmente rispondendo positivamente alla serie di studi preclinici effettuati in differenti modelli animali, mostrando un apprezzabile ed incoraggiante effetto analgesico.

Altra classe in grado di esercitare notevoli attività inibenti nei confronti di specifiche classi di HDAC sono gli acidi grassi a corta catena come il valproato di sodio ed il butirrato di sodio.

Il sodio valproato infatti ha mostrato notevoli effetti positivi in differenti modelli di dolore neuropatico, compresi quelli causati da agenti chemioterapici (CIPN *Chemiotherapy-induced peripheral neuropathy*) aprendo pertanto una interessante prospettiva nella terapia antitumorale, così come il sodio butirrato, inibitore non competitivo selettivo per la classe I e IIa, è in grado di attenuare notevolmente nel ratto i sintomi tipici del dolore neurogeno quali allodinia ed iperalgesia sia termica

che meccanica, nel modello CCI (*chronic constriction-injury*) tipicamente utilizzato quale modello animale di dolore neuropatico.²³²

Sebbene in realtà gli HDACi sino ad ora caratterizzati ed utilizzati manchino di specificità, differenti studi preclinici suggeriscono che i composti saggiati, siano notevolmente efficaci nel trattamento dei sintomi associati al dolore neurogeno. Dal momento però che i molteplici studi effettuati a tal proposito, hanno confermato che gli enzimi HDACs sono in grado di promuovere reazioni di deacetilazione anche in differenti proteine non istoniche, la capacità di un farmaco inibitore, di bloccare selettivamente l'attività di peculiari enzimi appartenenti, in questo specifico ambito clinico, alla classe I e II maggiormente coinvolti nella genesi della sintomatologia dolorifica, appare certamente più vantaggioso. Resta dunque ancora aperto il dibattito se gli HDACi, specifici per le varie isoforme, sono da preferire rispetto agli HDACi ad ampio spettro d'azione.

Non vi è dubbio quindi che l'indagine sempre più approfondita dei meccanismi sottostanti le modifiche cromatiniche nelle condizioni di dolore neuropatico saranno fondamentali per fornire importanti informazioni circa lo sviluppo di nuovi strumenti terapeutici potenti ed efficaci.

In **Tabella 5** sono riassunti i principali HDACi attualmente in sperimentazione clinica.

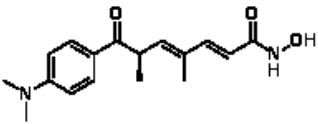
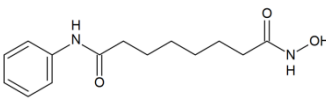
TABELLA 5 CARATTERISTICHE DEGLI INIBITORI ISTONE DEACETILASI (HDAC), ATTUALMENTE IN FASE DI SPERIMENTAZIONE CLINICA				
INIBITORI HDAC	STRUTTURA	CLASSE SPECIFICA HDAC	POTENZA	TRIALS CLINICI
<i>ACIDI IDROSSAMICI</i>				
Tricostatina A (TSA)		I, II, IV	nM	/
Vorinostat Acido idrossammico suberoilamide (SAHA)		I, II, IV	nM	La fase II e III è stata nel 2006 approvata dalla FDA

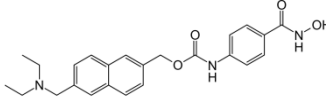
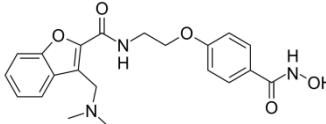
TABELLA 5 CARATTERISTICHE DEGLI INIBITORI ISTONE DEACETILASI (HDAC), ATTUALMENTE IN FASE DI SPERIMENTAZIONE CLINICA				
INIBITORI HDAC	STRUTTURA	CLASSE SPECIFICA HDAC	POTENZA	TRIALS CLINICI
<i>ACIDI IDROSSAMICI</i>				
Givinostat (ITF2357)		I, II	nM	Fase I, II
Abexinostat (PCI-24781)		I, II, IV	nM	Fase I, II

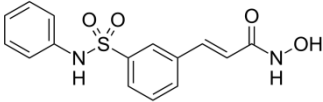
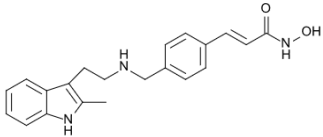
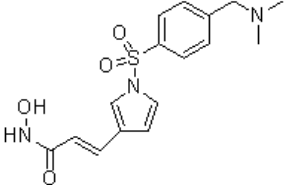
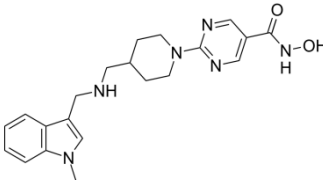
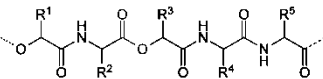
TABELLA 5 CARATTERISTICHE DEGLI INIBITORI ISTONE DEACETILASI (HDAC), ATTUALMENTE IN FASE DI SPERIMENTAZIONE CLINICA				
INIBITORI HDAC	STRUTTURA	CLASSE SPECIFICA HDAC	POTENZA	TRIALS CLINICI
<i>ACIDI IDROSSAMICI</i>				
Belinostat (PXD101)		I, II, IV	μM	Fase I, II
Panobinostat (LBH589)		I, II, IV	μM	Fase II, III
Resminostat (4SC-201)		I, II, IV	μM	Fase I, II
Quisinostat (JNJ-26481585)		I, II, IV	μM	Fase I

TABELLA 5 CARATTERISTICHE DEGLI INIBITORI ISTONE DEACETILASI (HDAC), ATTUALMENTE IN FASE DI SPERIMENTAZIONE CLINICA				
INIBITORI HDAC	STRUTTURA	CLASSE SPECIFICA HDAC	POTENZA	TRIALS CLINICI
<i>PEPTIDI CICLICI</i>				
Depsipeptide (romidespin)		I	nM	La fase I e II è stata nel 2009 approvata dalla FDA

4.5 Ruolo degli HDACi nel trattamento del dolore neuropatico.

Il potenziale clinico dei composti appena menzionati come farmaci antineoplastici, è già notevolmente documentato da vari *trials* clinici effettuati in questi ultimi dieci anni, in cui HDACi, somministrati da soli o in associazione con chemioterapici convenzionali, hanno dato e continuano a dare risposte decisamente positive per il trattamento di tumori solidi o ematologici, portando infatti recentemente l'FDA ad approvare diversi rappresentanti di tale categoria, per il trattamento clinico di varie forme tumorali. La moltitudine di eventi cellulari e molecolari, ormai notevolmente comprovata, nella quale gli enzimi HDAC sono implicati, ha però portato la ricerca a rivolgere il proprio sguardo anche ad altri settori clinici, in cui l'utilizzo di HDACi come potenziali agenti terapeutici, sta portando ottimi ed incoraggianti risultati.

Infatti gli HDACi hanno mostrato, recentemente, una potenziale azione antivirale in cellule infettate dal virus dell'HIV,²³³ e sono risultati utili nel trattamento di numerosi disordini e patologie immunitarie ed infiammatorie, che vanno dall'artrite reumatoide alla sclerosi multipla, dal lupus eritematoso sistemico alla terapia antirigetto.²³⁴

In modo particolare, proprio in questi ultimi anni, un ramo della ricerca si è indirizzato al ruolo chiave che i meccanismi epigenetici svolgono nel dolore cronico e nell'analgesia, sia in termini di influenza sull'espressione di geni pro ed anti nocicettivi, sia sulla modulazione delle proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche degli analgesici tutt'ora in uso.^{229,235}

Recenti studi, hanno infatti evidenziato che la somministrazione di HDACi, od agenti acetilanti, è in grado di produrre una profonda analgesia in differenti modelli di dolore neuropatico, alleviando pertanto significativamente la condizione di iperalgesia tipica del dolore neurogeno, osservata sia nelle varie neuropatie conseguenti a lesioni nervose periferiche e centrali, sia nelle neuropatie iatrogene particolarmente indotte dai chemioterapici convenzionali(CIPN).²³⁶

Mediante questa serie di recenti studi, è stato infatti possibile appurare che a livello delle lamine superficiali del corno dorsale del midollo spinale, si evidenzia una elevata espressione di enzimi HDAC correlata probabilmente ai meccanismi di mantenimento del dolore persistente.²³⁰

Tale processo, giustifica come l'acetilazione istonica in particolare a livello della Lys 9 di H3 osservata nel MS, congiuntamente all'alterazione dell'espressione di mRNA, viene ritenuta notevolmente importante nei meccanismi di dolore neuropatico.²¹¹

I dati sperimentali attualmente ottenuti, concordano sul fatto che ad attenuare lo sviluppo dei tipici sintomi positivi del dolore neurogeno, siano prevalentemente gli HDACi appartenenti alle classi I e II, come confermato dai numerosi test preclinici in cui, la somministrazione di tali composti nel midollo spinale del ratto, determina una riduzione dell'iperalgesia e dell'allodinia della zampa di circa il 40% in differenti modelli analizzati che prevedono legatura del nervo sciatico, resezione di

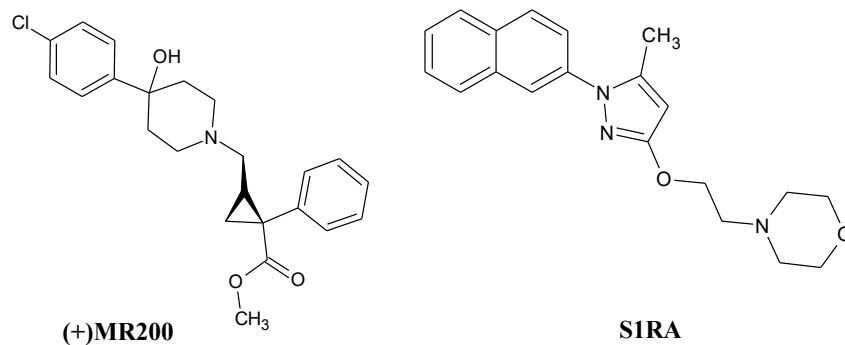
differenti nervi spinali e condizioni neuropatiche farmaco-indotte.^{229,237} Per poter spiegare l'attività analgesica indotta dagli HDACi, i ricercatori hanno proposto differenti meccanismi epigenetici. Inizialmente, come responsabile dell'effetto analgesico osservato per i primi due HDACi saggiati (SAHA e MS275), è stato appurato un aumento sia *in vitro* che *in vivo*, dell'espressione di recettori metabotropi per il glutammato di tipo 2 (mGluR2), a livello del corno posteriore del midollo spinale e nei gangli delle radici dorsali. Il meccanismo alla base di tale over-espressione di mGluR2, indotta da HDACi, sembra essere correlato all'attivazione del *pathway* NF-kB, mediante un aumento dell'acetilazione della subunità p65 a livello del residuo Lys 310.²⁰⁵

Il ruolo del fattore nucleare NF-kB in questo frangente, è chiaramente correlato alla sua capacità di iniziare una cascata di eventi, tra cui certamente un serie di meccanismi di *up-regulation* di differenti citochine, alcune delle quali ad azione pronocicettiva coinvolte in differenti processi patologici immunitari ed infiammatori, quali l'interferone- γ , l'interleuchina 6, l'interleuchina 1 β , ed in particolare il TNF- α .²³⁸ Differenti evidenze sperimentali, hanno infatti ormai confermato che il dolore di tipo neuropatico è associato ad un notevole aumento, nella cascata citochinica, della produzione di TNF- α , considerato per l'appunto prototipo dei mediatori pro-infiammatori, per il suo ben documentato ruolo nei meccanismi di sensitizzazione centrale e periferica tipici del dolore neurogeno.²³⁹ Alla luce di quanto detto pertanto, la riduzione dei livelli di TNF- α , in seguito alla *down-regulation* dell'espressione di citochine pro-infiammatorie mediata dagli HDACi, sembra essere il vero meccanismo responsabile degli effetti benefici, ottenuti nei differenti studi preclinici condotti sui ratti affetti da dolore neuropatico. Inoltre, Zang e collaboratori hanno recentemente dimostrato che nelle condizioni di dolore cronico di tipo neurogeno, la condizione di ipoacetilazione si ripercuote anche a livello del sistema GABAergico, portando infatti ad una soppressione dell'attività inibitoria mediata dal neurotrasmettitore GABA.²⁰⁵ La perdita dell'attività GABAergica a livello dei neuroni del corno dorsale del midollo spinale, associata per altro ad aumentati livelli di TNF- osservati in differenti colture neuronali, è chiaramente responsabile dei meccanismi di ipereccitabilità neuronale, alla base dei sintomi positivi registrati in questa condizione dolorifica.²⁴⁰ Tale meccanismo, giustifica quindi ulteriormente il responso positivo degli HDACi nei modelli di dolore neuropatico in quanto, riducendo i livelli di TNF- α , sono in grado di ristabilire anche la fisiologica attività GABAergica.²⁴¹ I risultati sin ora ottenuti a tal proposito, grazie all'elevata mole di studi condotti e tutt'ora in atto, si sono rivelati quindi fondamentali, per poter meglio comprendere il coinvolgimento dei processi epigenetici nella condizione di dolore neuropatico. Sebbene, i meccanismi che portano a tale condizione dolorifica restino ancora in parte sconosciuti, i dati riportati suggeriscono che l'interferenza chimica, mediante acetilazione istonica a livello delle corna dorsali del midollo spinale, è in grado di migliorare non solo la condizione di sensibilizzazione sia centrale

che periferica associata a varie neuropatie, ma di ripristinare altresì gli effetti analgesici indotti dalla morfina, bloccando la condizione di *down-regulation* dei recettori MOP, mediata da meccanismi di ipoacetilazione istonica nei neuroni del corno posteriore in seguito alla lesione nervosa.²⁴² Questa peculiare attività mostrata dagli HDACi, e valutata tramite i numerosi test preclinici effettuati in questi ultimi anni, sta pertanto facendo crescere sempre di più la speranza di poter ottenere nuovi potenziali strumenti terapeutici per il trattamento, tutt'ora carente, del dolore di origine neurogena.

4.6 Ruolo del recettore σ_1 nel trattamento del dolore neuropatico.

Il sistema recettoriale σ_1 gioca un ruolo determinante anche nei confronti della neurotrasmissione oppioide. La modulazione dell'analgia oppioide mediata dal recettore σ_1 fu proposta per la prima volta nel 1993, da Chien e Pasternak.²⁴³ Gli studi funzionali condotti su questa popolazione recettoriale, ormai 20 anni orsono, hanno permesso di identificare il σ_1 come un potente sistema endogeno anti-oppioide tonicamente attivo, in quanto, come già analizzato, si vide che agonisti σ_1 selettivi come la (+)pentazocina o il DTG erano in grado di contrastare fortemente l'analgia spinale e sovrspinale indotta dall'agonista oppioide morfina, mentre antagonisti come l'aloperidolo, ampiamente analizzato, aumentava notevolmente il responso farmacologico degli oppioidi potenziandone quindi l'effetto analgesico.²⁴³ Aspetto particolarmente interessante di questi studi, fu inoltre la capacità, mostrata dai ligandi σ_1 , di modulare l'analgia indotta dalla morfina senza però interferire minimamente con i suoi vari e conosciuti effetti indesiderati, valutando pertanto, come una terapia oppioide in combinazione con antagonisti σ_1 selettivi, potesse portare ad un importante potenziamento dell'analgia senza incrementare i tipici effetti collaterali come il rallentamento del transito gastrointestinale e soprattutto l'aumento della depressione respiratoria.²⁴⁴ Alla luce di questa notevole attività modulatrice, la ricerca, in questi ultimi anni, si è direzionata verso la progettazione e sintesi di diversi composti che potessero avere un profilo σ_1 antagonista, strutturalmente correlati all'Aloperidolo. Tra questi sono da citare sicuramente il S1RA (E-52862)²⁴⁵ attualmente in fase II di sperimentazione clinica su pazienti affetti da dolore neuropatico, il BD-1063, BD-1047, NE-100²⁴⁶ ed il (+)MR200 ed il suo correlato (-)MRV3 messi a punto dal gruppo di ricerca del professore Marrazzo, i quali confermano il controllo esercitato dai recettori σ_1 sulla analgia oppioide, potenziandone l'effetto.²⁴⁷⁻²⁵¹



L'azione di tale sinergia non è limitata all'analgesia μ -oppioide, ma una serie di studi sperimentali, condotti con differenti oppioidi, hanno confermato il ruolo dei recettori σ_1 anche nell'analgesia δ e κ indotta. In particolare, grazie agli studi effettuati da Marrazzo e collaboratori, è stato possibile chiarire come la somministrazione sistemica del ligando antagonista σ_1 selettivo (+)MR200, sia in grado di incrementare, ed aumentare nel tempo, l'analgesia indotta dalla somministrazione intracerebroventricolare (i.c.v.) degli agonisti oppioidi μ e δ selettivi DAMGO e DPDPE rispettivamente, nel test *tail flick* nel ratto.²⁵² (**Fig.4.5** e **Fig.4.6**)

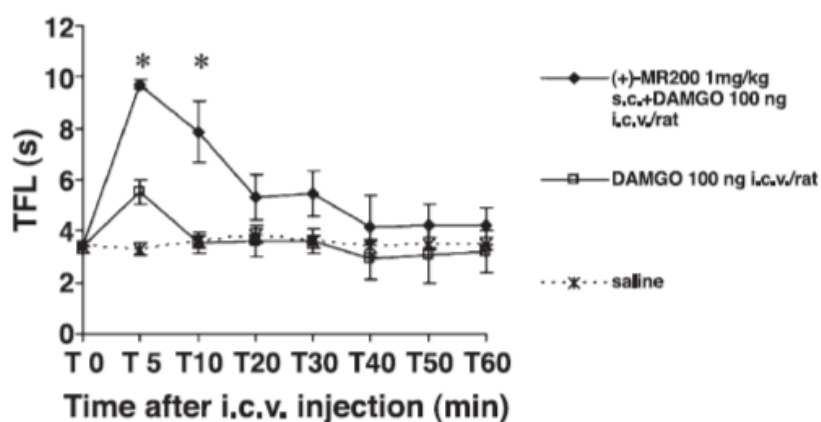


Fig. 4.5: Effetto di (+)MR200 dopo trattamento con DAMGO. Si nota come (+)MR200 aumenti la latenza del *tail flick* indotta da DAMGO.

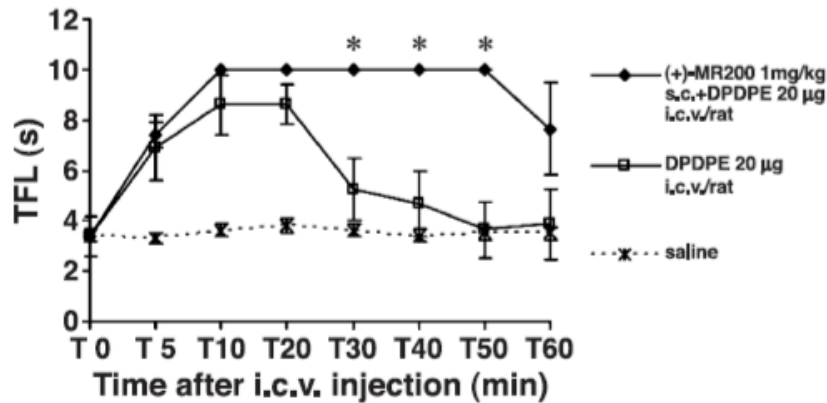


Fig. 4.6: Effetto di (+)MR200 dopo trattamento con DPDPE. Si nota come (+)MR200 aumenti la latenza del tail flick indotta da DPDPE.

Sebbene un analogo risultato si riscontri in seguito alla somministrazione, sempre i.c.v., dell'agonista $k1$ selettivo U50488H per i recettori k oppioidi, la sua somministrazione sottocutanea ha evidenziato un effetto invertito dell'antagonista σ_1 , giustificando quindi che l'azione modulatrice sull'analgesia oppioide è decisamente relata alla via di somministrazione, e che la discrepanza di tali risultati è probabilmente dovuta ai differenti meccanismi di interazione con i circuiti neuronali dei tre differenti sottotipi recettoriali oppioidi. Nel 2010 inoltre, il gruppo di ricerca di Kim e collaboratori ha evidenziato, tramite tecniche di co-immunoprecipitazione in cellule HEK transfettate, l'esistenza di una vera e propria interazione fisica tra le due differenti popolazioni recettoriali, e che quindi, la modulazione esercitata dai recettori σ_1 sull'effetto analgesico, sia dovuto all'interferenza con il meccanismo di trasduzione del segnale della proteina G del recettore oppioide.²⁵²

Il risultato ancor più interessante di recenti studi preclinici riguarda il coinvolgimento dei recettori σ_1 nei meccanismi di controllo del dolore anche in assenza di oppioidi, ed in particolare in condizioni di dolore cronico caratterizzati da meccanismi di sensitizzazione quali il dolore neuropatico.²⁴⁸

Tutto ciò ha consentito di stabilire il ruolo dei recettori σ_1 , nei meccanismi di modulazione del dolore, è stato sicuramente l'utilizzo di topi carenti del gene che codifica per tale struttura recettoriale, mediante un approccio di tipo genetico. Inoltre ha permesso di osservare come, in topi *Knockout (KO)* per il recettore σ_1 (Sig-1R KO), la risposta a stimoli meccanici e termici nocicettivi sia assolutamente indistinguibile da quella ottenuta dai topi *Wild Type (WT)*, confermando che la soglia di percezione delle normali sensazioni somatosensoriali non sono affatto influenzate dall'assenza del gene.

Diverso è invece il comportamento in particolari condizioni, infatti solo topi Sig-1R KO mostrano una forte attenuazione della condizione di iperalgesia meccanica indotta dalla somministrazione intraplantare di capsaicina e formalina, così come, in modelli di dolore neuropatico, la condizione di allodinia meccanica e termica, viene totalmente annullata o notevolmente ridotta, in seguito a legatura

del nervo sciatico o trattamento ad alte dosi con paclitaxel.^{253,244,254}

Il fatto che i due differenti gruppi di animali non mostrino differenze comportamentali, solo nelle risposte a normali stimoli termici e meccanici nocicettivi, è in accordo con l'ipotesi che il recettore σ_1 non è in grado di esercitare alcun effetto autonomamente, in condizioni fisiologiche, ma solo quando sono presenti condizioni di sensibilizzazione ed iperalgesia, tipici del dolore neuropatico. In tal modo quindi i ligandi antagonisti selettivi σ_1 , si comportano come potenziali agenti terapeutici ideali, avendo effetto solo in condizioni patologiche.²⁵⁵

L'approccio farmacologico, tramite la somministrazione di antagonisti selettivi σ_1 in topi WT, sottoposti alle precedenti condizioni, ha mostrato il medesimo effetto, inibendo quindi fortemente i meccanismi di iperalgesia, allodinia e sensibilizzazione centrale, suggerendo tali composti come potenziale terapia per il trattamento del dolore neuropatico.

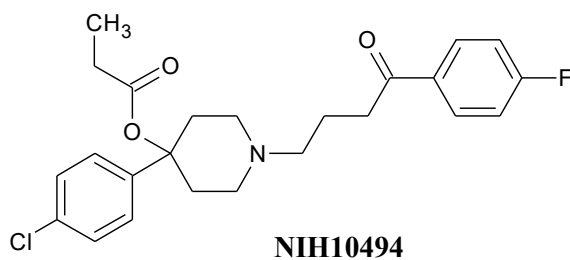
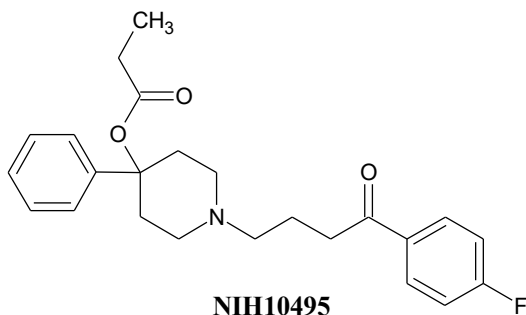
4.7 Scopo della ricerca.

Studi condotti da Woods, Smith, Medzhiradsky e Winger sul ligando oppioide NIH10495, strutturalmente correlato all'Aloperidolo, al fine di differenziarne l'effetto sul sito di legame della Fenilcilidina con ^3H -TCP come radioligando e con ^3H -(+)SKF 10,047 per esaminare la loro affinità sul sistema recettoriale σ_1 hanno messo in evidenza che grazie alla presenza dell'estere propilico in posizione 4 sulla piperidina il composto mostrava un tipico profilo analgesico oppioide.²⁵⁶

Fra i composti strutturalmente correlati all'Aloperidolo (NIH10494 e NIH10495) NIH10495 ha un effetto analgesico più spiccato rispetto a NIH10494. Entrambi i derivati spiazzano con buona affinità l' ^3H -(+)SKF 10,047 dal sito di legame σ_1 , ma NIH10494 non interagisce con il sito di binding della PCP. NIH10495 è un inusuale agonista oppioide nel MVD, in quanto la sua azione viene antagonizzata in maniera non competitiva dal Naltrexone. Infatti i saggi di binding mostrano un'affinità recettoriale simile alla morfina per il sito di legame del recettore oppioide.

Inoltre, in questi studi è stato evidenziato che NIH10495, *in vivo*, ha un inizio e durata d'azione simile alla morfina ed è approssimativamente 30 volte più potente della morfina quando raggiunge l'effetto massimo.

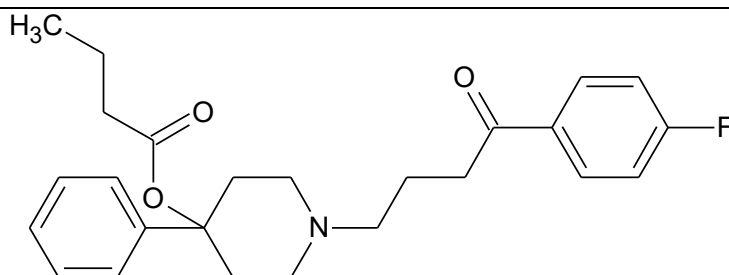
L'obiettivo di questa linea di ricerca è lo sviluppo di profarmaci utili nel trattamento del dolore neuropatico, sostanzialmente correlati all'agonista oppioide ad attività analgesica e neurolettica NIH10495,²⁵⁶ in grado di modulare l'attività oppioide interagendo da antagonista con il sistema recettoriale σ_1 e inibendo alcune isoforme dell'enzima HDAC (sottotipi I e IIa).²³⁰



A tale scopo si è pensato di progettare una serie di esteri dell'acido butirrico capaci di interagire in modo sinergico come agonisti oppioidi ed antagonisti σ_1 , ma allo stesso tempo capaci di idrolizzarsi in vivo liberando acido butirrico, inibitore classico degli enzimi HDACs. Allo scopo di ridurre la componente neurolettica dopaminergica la funzione chetonica è stata ridotta a gruppo alcolico che è stato ulteriormente esterificato con acido butirrico per rafforzare l'effetto inibitorio HDAC. I composti progettati e sintetizzati risultano i seguenti:

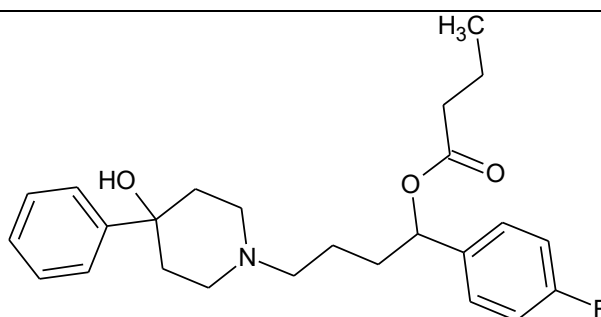
MRSV1

1-(4-(fluorofenil)-4-oxobutil)-4-fenilpiperidin-4-il butirrato



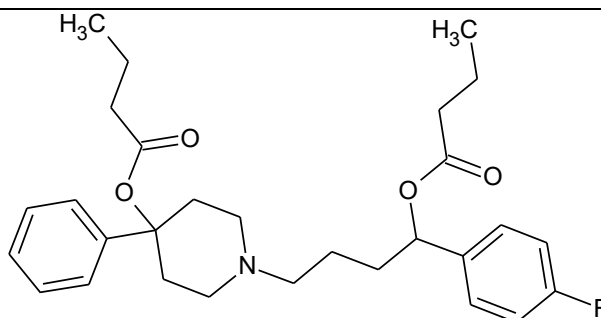
MRSV3

1-(4-fluorofenil)-4-(4-idrossi-4-fenilpiperidin-1-il)butil butirrato



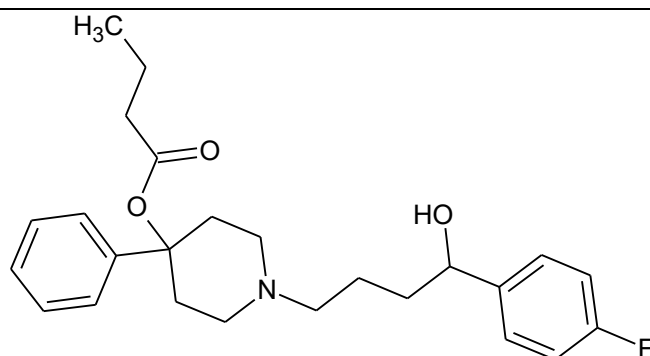
MRSV4

1-(4-(butirril-ossi)-4-(4-fluorofenil)butil)-4-fenilpiperidin-4-il butirrato



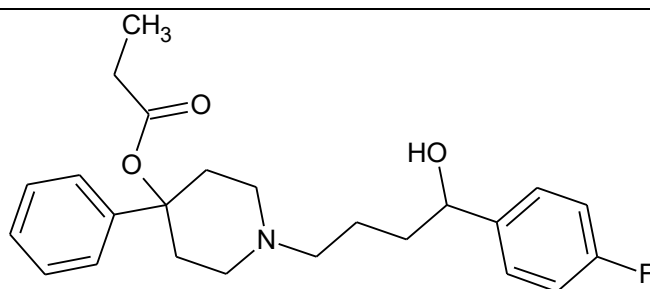
MRSV5

1-(4-(4-fluorofenil)-4-idrossibutil)-4-fenilpiperidin-4-il butirrato



MRSV6

1-(4-(4-fluorofenil)-4-idrossibutil)-4-fenilpiperidin-4-il propionato



PARTE SPERIMENTALE

5.1 MATERIALI E METODI.

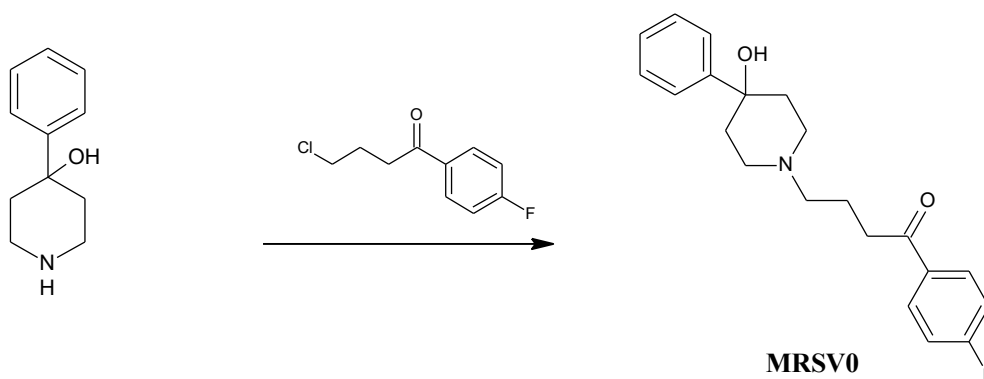
Gli spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR, sono stati registrati su uno spettrometro Varian Inova 500 MHz, e sono stati eseguiti in soluzione deuterata di CDCl_3 contenenti lo 0,03% di TMS (tetrametilsilano). Le purificazioni dei prodotti sono state eseguite mediante flash chromatography, utilizzando colonne in vetro del diametro compreso tra 1 e 4 cm, impaccate con gel di silice Si 60 0.040-0.063 mm 230-400 mesh (Merck). La purezza dei composti sintetizzati è stata verificata tramite cromatografia su strato sottile (TLC), su foglio di alluminio al gel di silice 60 F254 (Merck). I punti di fusione dei composti sintetizzati sono stati determinati mediante apparecchio BUCHI 530 utilizzando un tubo capillare aperto.

5.2 DISCUSSIONE CHIMICA.

Il percorso sintetico seguito per l'ottenimento del composto:

• **MRSV0** 1-(4-fluorofenil)-4-(4-idrossi-4-fenilpiperidin-1-il)butan-1-one prevede una reazione di sostituzione nucleofila tra la 4-fenilpiperidin-4-olo e il 4-cloro-1-(4-fluorofenil) butan-1-one in presenza di DMF anidra, KHCO_3 , 80 °C per 24 h. (**Schema 12**).

SCHEMA 12



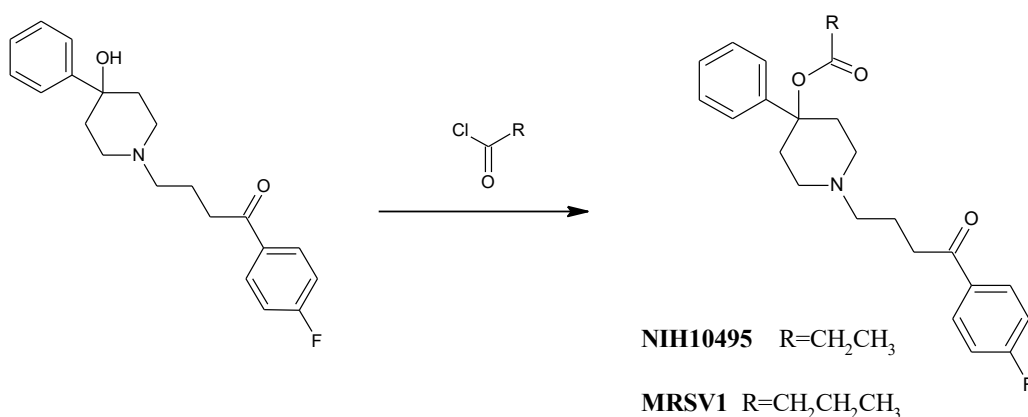
Schema 12. Reagenti e condizioni: DMF anidra, KHCO_3 , 80 °C per 24 h.

Il seguente derivato MRSV0 è stato successivamente utilizzato come intermedio per l'ottenimento dei seguenti prodotti:

- **MRSV1** 1-(4-(4-fluorofenil)-4-oxobutil)-4-fenilpiperidin-4-il butirrato
- **NIH 10495** 1-(4-(4-fluorofenil)-4-oxobutil)-4-fenilpiperidin-4-il propionato
- **MRSV7** 1-(4-(4-fluorofenil)-4-idrossibutil)-4-fenilpiperidin-4-olo

Le reazioni di esterificazione dell'1-(4-fluorofenil)-4-(4-idrossi-4-fenilpiperidin-1-il)butan-1-one (**MRSV0**) sono state condotte, rispettivamente, in presenza di propanoil-cloruro per l'ottenimento di **NIH 10495** e butanoil-cloruro per l'ottenimento di **MRSV1**, entrambe in presenza di THF anidro e TEA a 0 °C per 24h. (**Schema 13**).

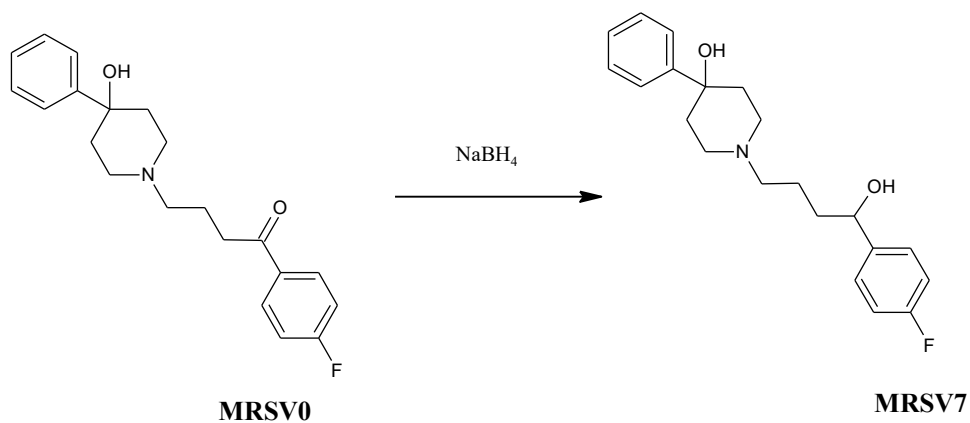
SCHEMA 13



Schema 13. Reagenti e condizioni: THF anidro, TEA a 0 °C per 24h.

La reazione di riduzione dell'1-(4-fluorofenil)-4-(4-idrossi-4-fenilpiperidin-1-il) butan-1-one (**MRSV0**) è stata condotta in presenza di NaBH₄ in EtOH anidro a 0°C per 12h, ottenendo **MRSV7** (**Schema 14**).

SCHEMA 14



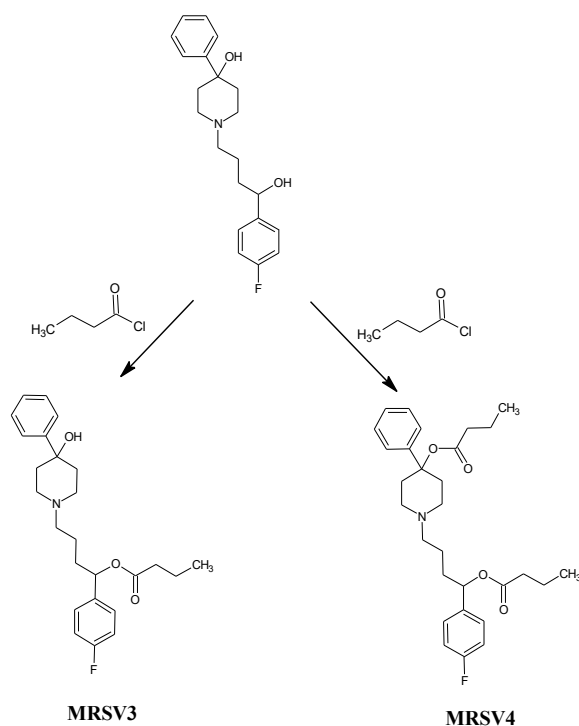
Schema 14. Reagenti e condizioni: EtOH anidro a 0 °C per 12h.

MRSV7 è stato successivamente utilizzato come intermedio di sintesi per l'ottenimento di

- **MRSV3** 1-(4-fluorofenil)-4-(4-idrossi-4-fenilpiperidin-1-il)butil butirato
- **MRSV4** 1-(4-(butiril-ossi)-4-(4-fluorofenil)butil)-4-fenilpiperidin-4-il butirato

La sintesi dei composti **MRSV3** e **MRSV4** è stata effettuata in un unico step. La reazione di esterificazione di **MRSV7** è stata condotta in presenza di butanoil-cloruro e TEA in THF anidro a 0°

C per 3h. (Schema 15).



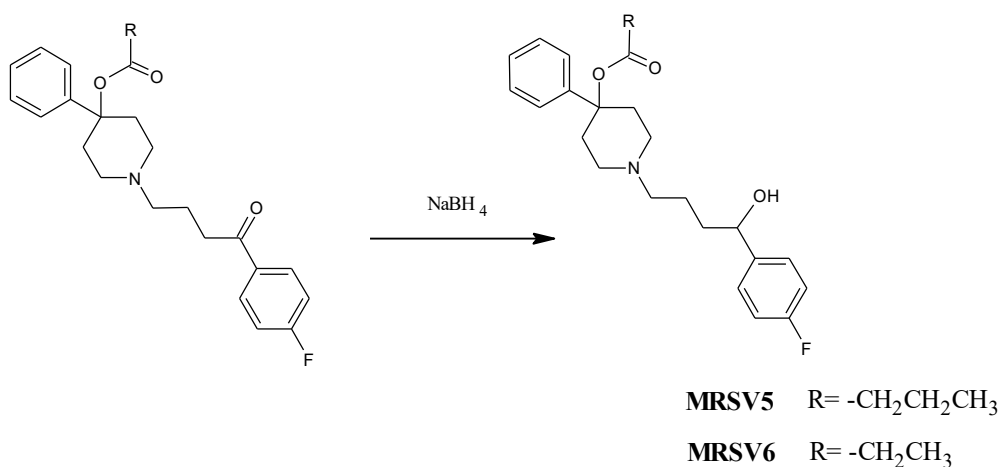
Schema 15. Reagenti e condizioni: THF anidro, TEA a 0°C per 3h.

Infine, **MRSV1** e **NIH10495** sono stati utilizzati come intermedi sintetici per l'ottenimento di:

- **MRSV5** 1-(4-(4-fluorofenil)-4-idrossibutil)-4-fenilpiperidin-4-il butirrato
- **MRSV6** 1-(4-(4-fluorofenil)-4-idrossibutil)-4-fenilpiperidin-4-il propionato

MRSV1 e **NIH10495** sono stati ridotti con NaBH_4 in presenza di EtOH anidro a 0°C per 5h, in modo tale da ottenere rispettivamente **MRSV5** e **MRSV6** (Schema 16).

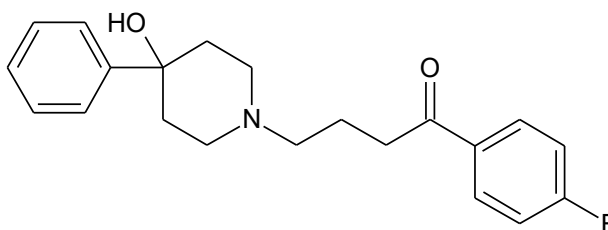
SCHEMA 16



Schema 16. Reagenti e condizioni: EtOH anidro a 0 °C per 5h.

5.3 SEZIONE SPERIMENTALE.

1-(4-fluorofenil)-4-(4-idrossi-4-fenilpiperidin-1-il)butan-1-one



MRSV0

Una soluzione di 4-fenilpiperidin-4-olo (0.5g, 2.82mmoli), DMF anidra (12ml) e KHCO_3 (0.56g, 5.6mmoli) viene posta sotto agitazione magnetica e riscaldata fino a 40°C per 15 minuti. Successivamente viene aggiunto goccia a goccia il 4-cloro-1-(4-fluoro-fenil)butan-1-one. La reazione viene lasciata reagire a 80°C per 24h. La miscela di reazione viene concentrata a pressione ridotta e il residuo ottenuto è stato ripreso con etil-acetato e lavato (3 volte) con una soluzione satura di NaHCO_3 (25ml). La fase organica viene anidrificata su Na_2SO_4 e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione è stato purificato tramite cromatografia *flash*, utilizzando un sistema eluente a gradiente Etil-Acetato/ CH_3OH . È stato ottenuto un prodotto bianco cristallino (355mg) 40% di resa. Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. $91.1\text{-}92.8^\circ\text{C}$).

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FNO}_2$ OSSALATO PM=431.45

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	64.03%	63.97%	0.06
H%	6.07%	6.02%	0.05
N%	3.25%	3.24%	0.01

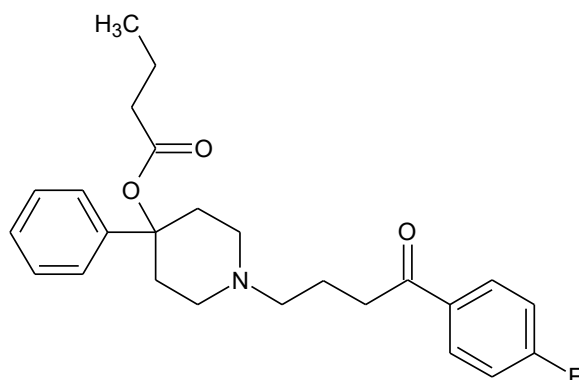
^1H NMR (CDCl_3) base libera

δ (ppm) 1.73 (d, 2H); 2.03 (m, 2H $J= 5.6\text{Hz}$); 2.16 (m, 2H $J= 5.0\text{Hz}$); 2.57 (m, 4H $J= 6.0\text{Hz}$); 2.89 (d, 2H); 3.012 (t, 2H); 7.12 (t, 1H $J= 3.5\text{Hz}$); 7.24 (m, 1H $J= 3.5\text{Hz}$); 7.33 (t, 1H $J= 3.0\text{Hz}$); 7.45 (d, 1H); 8.00 (m, 1H $J= 3.0\text{Hz}$).

^{13}C NMR (CDCl_3) base libera

δ (ppm) 21.20; 36.10; 37.75; 49.27; 57.55; 70.85; 115.50; 115.67; 124.45; 127.02; 128.29; 130.61; 130.68; 133.44; 133.46; 147.90; 164.61; 166.63; 198.12.

1-(4-(fluorofenil)-4-oxobutil)-4-fenilpiperidin-4-il butirrato



Una soluzione di **MRSV0** (0.2g, 0.58mmoli), THF anidro (6ml), TEA (0.059ml, 0.58mmoli), viene posta sotto agitazione magnetica a 0°C e viene aggiunto goccia a goccia il butanoil-cloruro (0.373ml, 3.5mmoli). Terminata l'aggiunta la reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24h. La reazione è stata monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1.

Alla miscela di reazione vengono aggiunti 15 ml di acqua deionizzata e si lascia agitare per un'ora. Successivamente la miscela è stata ripresa con CH₂Cl₂ e posta in un imbuto separatore. Si lava ripetutamente la fase organica con una soluzione al 4% di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene purificato tramite cromatografia *flash* utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. È stato ottenuto un prodotto oleoso giallo pallido (0.231g) 96% di resa.

Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 85.5-88.3 °C).

C₂₅H₃₀FNO₃ OSSALATO PM=501.54

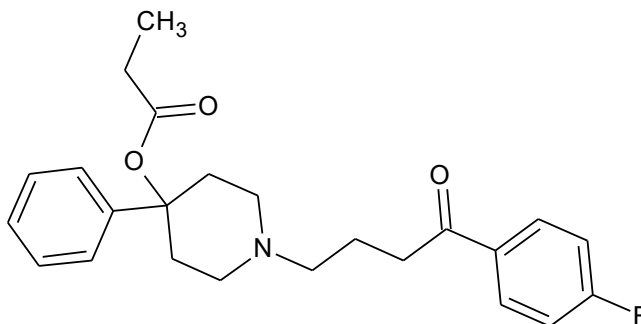
MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	64.66%	64.60%	0.06
H%	6.43%	6.38%	0.05
N%	2.79%	2.79%	0

¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 0.92 (t, 3H *J*= 3.6Hz); 1.58 (m, 2H *J*= 9.25Hz); 1.94 (m, 4H *J*= 7.8Hz); 2.26 (m, 4H *J*= 12.1Hz); 2.44 (m, 4H *J*= 3.6Hz); 2.77 (d, 2H); 2.96 (t, 2H *J*= 3.6Hz); 7.1 (m, 7H *J*= 29.2Hz); 7.98 (m, 2H *J*= 4.3Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 13.74; 18.43; 21.86; 35.48; 36.16; 37.24; 49.28; 57.64; 80.04; 115.45; 124.34; 127.13; 128.25; 130.63; 133.63; 144.47; 164.57; 166.58; 171.94; 198.33.

1-(4-(4-fluorofenil)-4-oxobutil)-4-fenilpiperidin-4-il propionato**NIH10495**

Una soluzione di **MRSV0** (0.2g, 0.58mmoli), THF anidro (6ml), TEA (0.059ml, 0.58mmoli), viene posta sotto agitazione magnetica a 0°C e viene aggiunto goccia a goccia il propanoil-cloruro (0.324ml, 3.5mmoli). Terminata l'aggiunta la reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 24h. La reazione è stata monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1.

Alla miscela di reazione vengono aggiunti 15 ml di acqua deionizzata e si lascia agitare per un'ora. Successivamente la miscela è stata ripresa con CH₂Cl₂ e posta in un imbuto separatore. Si lava ripetutamente la fase organica con una soluzione al 4% di NaHCO₃. La fase organica viene anidrificata su Na₂SO₄ e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo di reazione viene purificato tramite cromatografia *flash* utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. È stato ottenuto un prodotto oleoso giallo pallido (0.205g) 88% di resa.

Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 81-82 °C).

C₂₄H₂₈FNO₃ OSSALATO PM=487.51

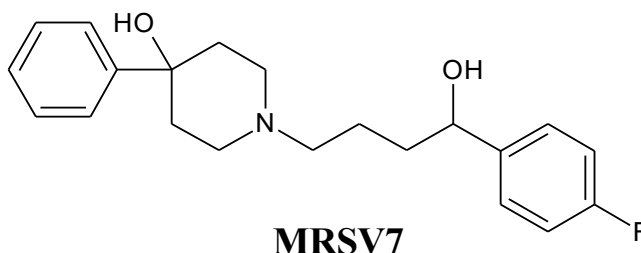
MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	64.05%	63.99%	0.06
H%	6.20%	6.15%	0.05
N%	2.87%	2.46%	0.41

¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.09 (m, 3H $J= 3.5$ Hz); 1.94 (m, 4H $J= 7$ Hz); 2.30 (m, 4H $J= 7$ Hz); 2.44 (m, 4H $J= 3.5$ Hz); 2.77 (d, 2H); 2.96 (t, 2H $J= 3.5$ Hz); 7.1 (m, 7H $J= 29.2$ Hz); 7.98 (m, 2H $J= 4.3$ Hz).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 9.17; 21.82; 28.56; 35.46; 36.14; 49.27; 57.63; 80.00; 115.46, 115.63; 124.40; 127.14; 128.28; 130.56; 130.63; 133.61; 144.42; 164.56; 166.58; 172.69; 198.32.

1-(4-(4-fluorofenil)-4-idrossibutil)-4-fenilpiperidin-4-olo

Ad una soluzione di **MRSV0** (0.4g, 1.17mmoli) in EtOH anidro (15ml) a 0°C è stato aggiunto NaBH₄ (0.044g, 1.17mmoli). La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica per 12h a temperatura ambiente. La reazione è stata monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1.

Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 20ml di una soluzione satura di NaHCO₃ e lasciata agitare per 20 minuti. Successivamente la fase acquosa viene estratta 3 volte con CH₂Cl₂ e anidrificata su Na₂SO₄ e concentrata a pressione ridotta.

Il grezzo di reazione è stato purificato tramite cromatografia *flash* utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. È stato ottenuto un solido bianco (0.365g) 91% di resa.

Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 87.3-89.2 °C).

C₂₁H₂₆FNO₂ OSSALATO PM=433.47

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	63.73%	63.67%	0.06
H%	6.51%	6.45%	0.06
N%	3.23%	3.22%	0.01

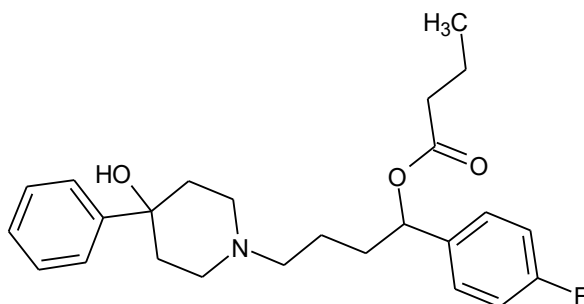
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.68 (m, 6H $J= 18.12\text{Hz}$); 1.91 (m, 2H $J= 8.25\text{Hz}$); 2.23 (m, 2H $J= 9.62\text{Hz}$); 2.52 (m, 3H $J= 6.5\text{Hz}$); 2.62 (m, 1H $J= 6.5\text{Hz}$); 2.82 (d, 1H); 3.02 (d, 1H); 4.64 (t, 1H); 6.97 (m, 9H).

^{13}C NMR (CDCl_3) base libera

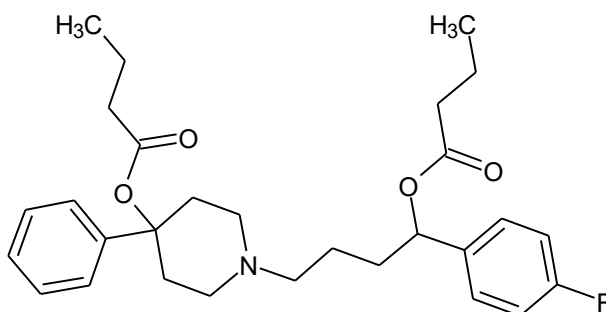
δ (ppm) 23.91; 37.60; 48.62; 50.06; 58.72; 70.94; 73.09; 114.78; 114.95; 124.54; 127.17; 128.37; 141.56; 147.63; 160.77; 162.71.

1-(4-fluorofenil)-4-(4-idrossi-4-fenilpiperidin-1-il)butil butirrato



MRSV3

1-(4-(butiril-ossi)-4-(4-fluorofenil)butil)-4-fenilpiperidin-4-il butirrato



MRSV4

I prodotti **MRSV3** e **MRSV4** sono stati ottenuti in un unico step.

Una soluzione di **MRSV7** (0.365g, 1.06mmoli), THF anidro (15ml) e TEA (0.107ml, 1.06mmoli) viene posta sotto agitazione magnetica a 0°C e viene aggiunto goccia a goccia il butanoil-cloruro (0.68ml, 6.38mmoli). Terminata l'aggiunta la reazione viene lasciata a temperatura ambiente per 3h. La reazione è stata monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/CH₃OH 9.5:0.5.

Alla miscela di reazione viene addizionata una soluzione satura di NaHCO₃ (20ml) e si lascia agitare per 20 minuti. La fase acquosa viene estratta 3 volte con CH₂Cl₂. La fase organica viene, quindi, anidrificata su Na₂SO₄ e concentrata a pressione ridotta.

Il grezzo di reazione è stato purificato tramite cromatografia *flash* utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. Sono stati ottenuti 2 prodotti giallo pallido e di consistenza oleosa: **MRSV3** (0.112g) 25.57% di resa e **MRSV4** (0.368g) 71.23% di resa. La reazione ha avuto una resa totale del 97%. Entrambi i prodotti sono stati opportunamente trasformati in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitati con (CH₃CH₂)₂O, filtrati ed essiccati sottovuoto.

MRSV3 (p.f. 83.6-85.9°C)

C₂₅H₃₂FNO₃ OSSALATO PM=503.53

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	64.40%	64.34%	0.06
H%	6.81%	6.75%	0.06
N%	2.78%	2.78%	0

¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 0.89 (m, 3H *J*= 5.8Hz); 1.55 (m, 8H); 1.88 (m, 1H *J*= 5.8Hz); 2.16 (t, 1H *J*= 3.7Hz); 2.24 (m, 4H); 2.62 (t, 2H *J*= 5.8Hz); 2.75 (t, 2H *J*= 5.8Hz); 3.03 (d, 2H); 5.7 (m, 1H); 7.03 (m, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 13.89; 18.34; 21.22; 33.87; 36.30; 38.04; 48.55; 56.96; 70.13; 74.44; 115.28; 115.45; 124.41; 127.22; 128.11; 128.49; 136.05; 147.25; 161.32; 163.28; 172.86; 178.86.

MRSV4 (p.f. 112.1-114.6 °C)

C₂₉H₃₈FNO₄ OSSALATO PM=573.65

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	64.39%	64.32%	0.07
H%	6.84%	6.79%	0.05
N%	2.50%	2.50%	0

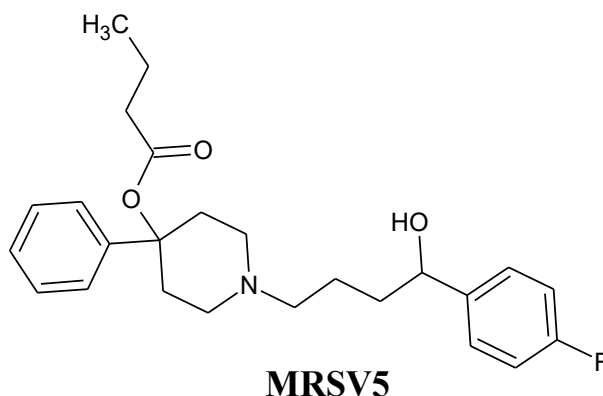
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 0.87 (m, 6H); 1.54 (m, 8H); 1.75 (m, 1H *J*= 9Hz); 1.84 (m, 1H); 2.18 (m, 8H); 2.48 (m, 6H); 3.06 (d, 2H); 5.71 (t, 1H); 6.99 (m, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 13.50; 13.63; 18.30; 18.68; 21.42; 34.05; 36.26; 37.06; 48.39; 57.02; 74.45; 79.17; 115.18; 115.35; 124.38; 127.41; 128.07; 128.33; 136.11; 143.25; 161.26; 163.22; 171.78; 172.76; 178.07.

1-(4-(4-fluorofenil)-4-idrossibutil)-4-fenilpiperidin-4-il butirrato



Ad una soluzione di **MRSV1** (0.061g, 0.15mmoli) in EtOH anidro (5ml) a 0°C è stato aggiunto NaBH₄ (0.0056g, 0.15mmoli). La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica per 5h a temperatura ambiente. La reazione è stata monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/CH₃OH 9.5:0.5. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 10ml di una soluzione satura di NaHCO₃ e lasciata agitare per 20 minuti. Successivamente la fase acquosa viene estratta 3 volte con CH₂Cl₂ e anidrificata su Na₂SO₄ e concentrata a pressione ridotta.

Il grezzo di reazione è stato purificato tramite cromatografia *flash* utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. È stato ottenuto un solido bianco (0.041g) 67% di resa.

Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 121.2-124.6 °C).

C₂₅H₃₂FNO₃ OSSALATO PM=503.56

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	64.40%	64.34%	0.06
H%	6.81%	6.75%	0.06
N%	2.78%	2.78%	0

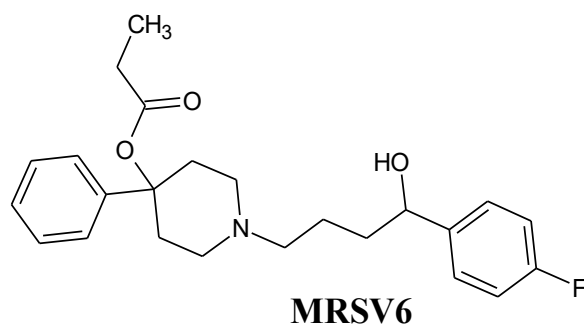
¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 0.91 (m, 3H *J*= 3.6Hz); 1.6 (m, 5H *J*= 3.6Hz); 1.93 (m, 1H *J*= 6Hz); 2.14 (m, 2H *J*= 5.6Hz); 2.27 (t, 2H *J*= 3.6Hz); 2.34 (m, 1H *J*= 5.6Hz); 2.47 (m, 5H); 2.81 (d, 1H); 3.01 (d, 1H); 4.62 (br s, 1H); 6.96 (m, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 13.73; 18.41; 24.11; 34.81; 35.30; 37.19; 40.13; 48.54; 49.99; 58.71; 73.13; 79.73; 114.73; 114.90; 124.59; 127.10; 127.34; 128.27; 141.53; 143.67; 160.72; 162.66; 171.98.

1-(4-(4-fluorofenil)-4-idrossibutil)-4-fenilpiperidin-4-il propionato



Ad una soluzione di **NIH10495** (0.080g, 0.20mmoli) in EtOH anidro (5ml) a 0°C è stato aggiunto NaBH₄ (0.0076g, 0.20mmoli). La reazione viene lasciata sotto agitazione magnetica per 5h a temperatura ambiente. La reazione è stata monitorata tramite TLC con eluente CH₂Cl₂/CH₃OH 9.5:0.5. Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 10ml di una soluzione satura di NaHCO₃ e lasciata agitare per 20 minuti. Successivamente la fase acquosa viene estratta 3 volte con CH₂Cl₂ e anidrificata su Na₂SO₄ e concentrata a pressione ridotta.

Il grezzo di reazione è stato purificato tramite cromatografia *flash* utilizzando un sistema eluente a gradiente CH₂Cl₂/CH₃OH. È stato ottenuto un solido bianco (0.063g) 78% di resa.

Il prodotto è stato opportunamente trasformato in ossalato per aggiunta di acido ossalico 1 M, precipitato con (CH₃CH₂)₂O, filtrato ed essiccato sottovuoto. (p.f. 148.5-151.2 °C).

C₂₄H₃₀FNO₃ OSSALATO PM=489.53

MICROANALISI			
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
C%	63.79%	63.73%	0.06
H%	6.59%	6.53%	0.06
N%	2.86%	2.85%	0.01

¹H NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 1.09 (t, 2H *J*= 6.4Hz); 1.66 (m, 1H); 1.92 (dt, 1H *J*= 5.7Hz); 2.15 (m, 2H *J*= 5.7Hz); 2.32 (m, 3H); 2.48 (m, 5H); 2.81 (d, 1H); 3.02 (d, 1H); 4.36 (m, 1H); 6.97 (m, 9H).

¹³C NMR (CDCl₃) base libera

δ (ppm) 9.16; 24.12; 28.55; 34.82; 35.31; 40.14; 48.56; 50.01; 58.72; 73.16; 79.70; 114.76; 114.93; 124.24; 127.11; 127.39; 128.32; 128.56; 141.56; 143.66; 160.75; 162.69; 172.68.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. www.who.int/mediacentre/fs297/en/
2. Kushi, L. H.; Byers, T.; Doyle, C.; Bandera, E. V.; McCullough, M.; McTiernan, A.; Gansler, T.; Andrews, K. S.; Thun, M. J. American Cancer Society Guidelines on Nutrition and Physical Activity for cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity in *CA Cancer Journal for Clinicians*, **2006**, 56(5), 254–281
3. Robbins. *Basic Pathology*, VIII ed. Saunders/Elsevier **2007**, cap. 6
4. www.corriere.it/salute/neoplasia/
5. Barret, J.C. Mechanism of action knows human carcinogens *Environmental Health Perspectives* **1993**, 100, 9-20.
6. Chène, P. Inhibiting the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy *Nature Reviews Cancer* **2003**, 3, 102-109.
7. Yamasaki, H.; Krutovskikh, V.; Mensil, M.; Columbano, A.; Tsuda, H.; Ito, N. Gap junctional intercellular communications and cell proliferations during rat liver carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* **1993**, 101(5), 191-197.
8. Goodman e Gilman. *Le basi farmacologiche della terapia* XI ed McGraw-Hill **2006**, 51, 1315-1389.
9. Slamon, D.J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine* **2001**, 344 (11), 783-792.
10. Citron, M.L.; Berry, D.A.; Cirincione, C.; Hudis, C.; Winer, E.P.; Gradishar, W.J.; Davidson, N.E.; Martino, S.; Livingston, R.; Ingle, J.N.; Perez, E.A.; Carpenter, J.; Hurd, D.; Holland, J.F.; Smith, B.L.; Sartor, C.I.; Leung, E.H.; Abrams, J.; Schilsky, R.L.; Muss, H.B.; Norton, L. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *Journal of Clinical Oncology* **2003**, 21 (8), 1431-1439.
11. Sawyer, M.; Ratain, M.J. Body surface area as a determinant of pharmacokinetics and drug dosing. *Invest New Drugs* **2001**, 19 (2), 171-177.
12. Lemke, T.L.; Williams, D.A. *Foye's Principi di Chimica Farmaceutica*. Piccin **2010**, 1252-1299.
13. Rowinsky, E.K.; Tolcher, A.W. Antimicrotubule agents. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 7th Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins **2005**, 390-416.

14. Pellegrini, F.; Budman, D.R. Review: tubulin function, actions of antitubulin drugs, and new drug development. *Cancer Invest* **2005**, *23*, 264-273.
15. Riganti, C.; Miraglia, E.; Viarasio, D.; Costamagna, C.; Pescarmona, G.; Ghigo, D.; Bosia, A. Nitric Oxide Reverts the Resistance to Doxorubicin in Human Colon Cancer Cells by Inhibiting the Drug Efflux. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 516–525.
16. Sorrentino, B.P. Gene Therapy to Protect Hematopoietic Cells from Cytotoxic Cancer Drugs. *Nature Reviews*, **2002**, *2*, 431-441.
17. Jones, M.L.; Ganopolsky, J. G.; Labbé, A.; Wahl, C.; Prakash, S. Antimicrobial Properties of Nitric Oxide and Its Application in Antimicrobial Formulations and Medical Devices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 401–407.
18. Wang, G. R.; Zhu, Y.; Halushka, P. V.; Lincoln, T. M.; Mendelsohn, M. E. Mechanism of Platelet Inhibition by Nitric Oxide: In Vivo Phosphorylation of Thromboxane Receptor by Cyclic GMP-Dependent Protein Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **1998**, *95*, 4888–4893.
19. Rosselli, M.; Keller, P. J.; Dubey, R. K. Role of Nitric Oxide in the Biology, Physiology and Pathophysiology of Reproduction. *Hum. Reprod. Update* **1998**, *4*, 3–24.
20. Massion, P. B.; Feron, O.; Dessy, C.; Balligand, J.-L. Nitric Oxide and Cardiac Function: Ten Years After, and Continuing. *Circ. Res.* **2003**, *93*, 388–398.
21. Kiss, J. P. Role of Nitric Oxide in the Regulation of Monoaminergic Neurotransmission. *Brain Res. Bull.* **2000**, *52*, 459–466.
22. Choudhari, S. K.; Chaudhary, M.; Bagde, S.; Gadgil, A. R.; Joshi, V. Nitric Oxide and Cancer: A Review. *World J. Surg. Oncol.* **2013**, *11*, 118.
23. Cobbs, C. S.; Brenman, J. E.; Aldape, K. D.; Bredt, D. S.; Israel, M. A. Expression of Nitric Oxide Synthase in Human Central Nervous System Tumors. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 727–730.
24. Taysi, S.; Uslu, C.; Akcay, F.; Sutbeyaz, M. Y. Malondialdehyde and Nitric Oxide Levels in the Plasma of Patients with Advanced Laryngeal Cancer. *Surg. Today* **2003**, *33*, 651–654.
25. Thomsen, L. L.; Lawton, F. G.; Knowles, R. G.; Beesley, J. E.; Riveros-Moreno, V.; Moncada, S. Nitric Oxide Synthase Activity in Human Gynecological Cancer. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1352–1354.
26. Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109–142.
27. Blaise, G. A.; Gauvin, D.; Gangal, M.; Authier, S. Nitric Oxide, Cell Signaling and Cell Death. *Toxicology* **2005**, *208*, 177–192.
28. Ahern, G. P.; Klyachko, V. A.; Jackson, M. B. cGMP and S-Nitrosylation: Two Routes for Modulation of Neuronal Excitability by NO. *Trends Neurosci.* **2002**, *25*, 510–517.

29. Gallo, O.; Masini, E.; Morbidelli, L.; Franchi, A.; Fini-Storchi, I.; Vergari, W. A.; Ziche, M. Role of Nitric Oxide in Angiogenesis and Tumor Progression in Head and Neck Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 587–596.
30. Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315–424.
31. Laval, J. Role of DNA Repair Enzymes in the Cellular Resistance to Oxidative Stress. *Pathologie-biologie* **1996**, *44*, 14–24.
32. Ridnour, L. A.; Thomas, D. D.; Switzer, C.; Flores-Santana, W.; Isenberg, J. S.; Ambs, S.; Roberts, D. D.; Wink, D. A. Molecular Mechanisms for Discrete Nitric Oxide Levels in Cancer. *Nitric oxide: Biol. Chem. / Off. J. Nitric Oxide Soc.* **2008**, *19*, 73–76.
33. Wink, D. A.; Vodovotz, Y.; Laval, J.; Laval, F.; Dewhirst, M. W.; Mitchell, J. B. The Multifaceted Roles of Nitric Oxide in Cancer. *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 711–721.
34. Hirst, D.; Robson, T. Nitric Oxide in Cancer Therapeutics: Interaction with Cytotoxic Chemotherapy. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 411–420.
35. Sharma, K.; Chakrapani, H. Site-Directed Delivery of Nitric Oxide to Cancers. *Nitric oxide: Biol. Chem. / Off. J. Nitric Oxide Soc.* **2014**, *43*, 8–16.
36. Xu, W.; Liu, L. Z.; Loizidou, M.; Ahmed, M.; Charles, I. G. The Role of Nitric Oxide in Cancer. *Cell Res.* **2002**, *12*, 311–320.
37. Carpenter, A. W.; Schoenfisch, M. H. Nitric Oxide Release: Part II. Therapeutic Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 3742–3752.
38. Ellis-Davies, G. C. R. Caged Compounds: Photorelease Technology for Control of Cellular Chemistry and Physiology. *Nat. methods* **2007**, *4*, 619–628.
39. Nakagawa, H.; Hishikawa, K.; Eto, K.; Ieda, N.; Namikawa, T.; Kamada, K.; Suzuki, T.; Miyata, N.; Nabekura, J. Fine Spatiotemporal Control of Nitric Oxide Release by Infrared Pulse-Laser Irradiation of a Photolabile Donor. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2493–2500.
40. Yatvin, M. B.; Weinstein, J. N.; Dennis, W. H.; Blumenthal, R. Design of Liposomes for Enhanced Local Release of Drugs by Hyperthermia. *Science* **1978**, *202*, 1290–1293.
41. Tai, L.-A.; Wang, Y.-C.; Yang, C.-S. Heat-Activated Sustaining Nitric Oxide Release from Zwitterionic Diazeniumdiolate Loaded in Thermo-Sensitive Liposomes. *Nitric oxide: Biol. Chem./Off. J. Nitric Oxide Soc.* **2010**, *23*, 60–64.
42. Callari, F. L.; Sortino, S. Amplified Nitric Oxide Photorelease in DNA Proximity. *Chem. Commun.* **2008**, 1971–1973.
43. Ostrowski, A. D.; Ford, P. C. Metal Complexes as Photochemical Nitric Oxide Precursors: Potential Applications in the Treatment of Tumors. *Dalton Trans.* **2009**, 10660–10669.

44. Lee, H. M.; Larson, D. R.; Lawrence, D. S. Illuminating the Chemistry of Life Design, Synthesis, and Applications of “Caged” and Related Photoresponsive Compounds. *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4, 409–427.
45. Varchi, G.; Rapozzi, V.; Ragno, D.; Castoria, G.; Di Donato, M.; Della Pietra, E.; Benfenati, V.; Ferroni, C.; Guerrini, A.; Cesselli, D.; Saracino, E. Androgen Receptor Targeted Conjugate for Bimodal Photodynamic Therapy of Prostate Cancer in Vitro. *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26 (8), 1662-1671.
46. Wood, P. D.; Johnston, L. J. Photoionization and Photosensitized Electron-Transfer Reactions of Psoralens and Coumarins. *J. Phys. Chem.* **1998**, 102, 5585–5591.
47. Koudinova, N. V.; Pinthus, J. H.; Brandis, A.; Brenner, O.; Bendel, P.; Ramon, J.; Eshhar, Z.; Scherz, A.; Salomon, Y. Photodynamic Therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): Successful in Vivo Treatment of Human Prostatic Small Cell Carcinoma Xenografts. *Int. J. Cancer. J. Int. du Cancer* **2003**, 104, 782–789.
48. Cadeddu, J. A. Re: TOOKAD® Soluble Vascular-Targeted Photodynamic (VTP) Therapy: Determination of Optimal Treatment Conditions and Assessment of Effects in Patients with Localised Prostate Cancer. *J. Urol.* **2014**, 191.
49. Allen, T. M. Ligand-Targeted Therapeutics in Anticancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, 2, 750–763.
50. Thomas, M.; Kularatne, S. A.; Qi, L.; Kleindl, P.; Leamon, C. P.; Hansen, M. J.; Low, P. S. Ligand-Targeted Delivery of Small Interfering RNAs to Malignant Cells and Tissues. *Ann. New York Acad. Sci.* **2009**, 1175, 32–39.
51. Xia, W.; Low, P. S. Folate-Targeted Therapies for Cancer. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 6811–6824.
52. Shin, G.; Kang, T. W.; Yang, S.; Baek, S. J.; Jeong, Y. S.; Kim, S. Y. GENT: Gene Expression Database of Normal and Tumor Tissues. *Cancer Informatics* **2011**, 10, 149–157.
53. Crane, L. M. A.; Arts, H. J. G.; Van Oosten, M.; Low, P. S.; Van der Zee, A. G. J.; Van Dam, G. M.; Bart, J. The Effect of Chemotherapy on Expression of Folate Receptor-Alpha in Ovarian Cancer. *Cell. Oncol.* **2012**, 35, 9–18.
54. Spitzer, D.; Simon, P. O.; Kashiwagi, H.; Xu, J.; Zeng, C.; Vangveravong, S.; Zhou, D.; Chang, K.; McDunn, J. E.; Hornick, J. R.; Goedegebuure, P.; Hotchkiss, R. S.; Mach, R. H.; Hawkins, W. G. Use of Multifunctional Sigma-2 Receptor Ligand Conjugates to Trigger Cancer-Selective Cell Death Signaling. *Cancer Res.* **2012**, 72, 201–209.
55. Srinivasarao, M.; Galliford, C. V.; Low, P. S. Principles in the Design of Ligand-Targeted Cancer Therapeutics and Imaging Agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, 14, 203–219.
56. Martin, W. R.; Eades, C. G.; Thompson, J. A.; Huppler, R. E.; Gilbert, P. E. The effects of

- morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*. **1976**, 197, 517-532.
57. Su, T. P. Evidence for sigma-opioid receptor: binding of [3H]-SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics* **1982**, 223, 284-290.
 58. Vaupel, D. B. Naltrexone fails to antagonize the sigma effects of PCP and SKF-10,047 in the dog. *European Journal of Pharmacology*. **1983**, 92, 269-274.
 59. Young, G. A.; Khazan, N. Differential neuropharmacological effects of mu, kappa and sigma opioid agonists on cortical EEG power spectra in the rat. Stereospecificity and naloxone antagonism. *Neuropharmacology*. **1984**, 23, 1161-1165.
 60. Berzetei-Gurske, I. P.; Toll, L. The mu-opioid activity of kappa-opioid receptor agonist compounds in the guinea pig ileum. *European Journal of Pharmacology* **1992**, 212, 283- 286.
 61. Mendelsohn, L. G.; Kalra, V.; Johnson, B. G.; Kerchner, G. A. Sigma opioid receptor: characterization and co-identity with the phencyclidine receptor. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*. **1985**, 233, 597-602.
 62. Zukin, S. R.; Brady, K. T.; Slifer, B. L.; Balster, R. L. Behavioral and biochemical stereoselectivity of sigma opiate/PGP receptors. *Brain Research*. **1984**, 174-177.
 63. Quirion, R.; Hammer, P. Jr.; Herkenham, M.; Pert, C. B. The phencyclidine (angel dust)/sigma 'opiate' receptor: Its visualization by tritium-sensitive film. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **1981**, 78, 5881-5885.
 64. Tam, S. W.; Cook, L. Sigma opiates and certain antipsychotic drugs mutually inhibit (+)-[3H] SKF 10,047 and [3H]-haloperidol binding in guinea pig brain membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **1984**, 81(17), 5618-5621.
 65. Bowen, W. D. Sigma receptors: recent advances and new clinical potentials. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. **2000**, 74, 211–218.
 66. Hellewell, S. B.; Bowen, W. D. A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)-benzomorphans and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain. *Brain Research*. **1990**, 527(2), 244-253.
 67. Quirion, R. Bowen, W. D.; Itzhak, Y.; Junien, J. L.; Musacchio, J. M.; Rothman, R. B.; Su, T.; Tam, S. W.; Taylor, D. A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacology Sciences*. **1992**, 13, 85-86.
 68. Bowen, W. D.; De Costa, B. R.; Hellewell, S. B.; Walker, J. M.; Rice, K. C. [3H](+)Pentazocine: a potent and highly selective benzomorphan-based probe for sigma 1 receptors. *Molecular Neuropharmacology* **1993**, 3, 117-126.

69. Hellewell, S. B.; Bruce, A.; Feinstein, G.; Orringer, J.; Williams, W.; Bowen W. D. Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *European Journal of Pharmacology* **1994**, 268(1), 9-18.
70. Hayashi, T.; Su, T. P. Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs*. **2004**, 18(5), 269-284.
71. Hanner, M.; Moebius, F. F.; Flandorfer, A.; Knaus, H. G.; Striessnig, J.; Kempner, E.; Glossmann, H. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*.**1996**, 93, 8072- 8077.
72. Kekuda, R.; Prasad, P. D.; Fei, Y. J.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V. Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, 229, 553-558.
73. Seth, P.; Fei, Y. J.; Huang, W.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V. Cloning and functional characterization of a sigma receptor from rat brain. *Journal of Neurochemistry* **1998**, 70, 922–931.
74. Seth, P.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V. Cloning and structural analysis of the cDNA and the gene encoding the murine type 1 sigma receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, 241, 535-540.
75. Mei, J.; Pasternak, G. W. Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma1 receptor. *Biochemistry Pharmacology* **2001**, 62, 349–355.
76. Aydar, E.; Palmer, C. P.; Klyachko, V. A.; Jackson, M. B. The sigma receptors as a ligand regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron* **2002**, 34(3), 399-410.
77. Pal, A.; Hajipour, A. R.; Fontanilla, D.; Ramachandran, S.; Chu, U. B.; Mavlyutov, T.; Ruoho, A. E. Identification of regions of the sigma1 receptor ligand binding site using a novel photoprobe. *Molecular Pharmacology* **2007**, 72(4), 921-933.
78. Prasad, P. D. ; Li, H. W.; Fei, Y.J.; Ganapathy, M. E.; Fujita, T.; Plumley, L. H.; Yang-Feng, T. L.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V. Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene. *Journal of Neurochemistry* **1998**, 70 (2), 433-451.
79. Yamamoto, H.; Miura, R.; Yamamoto, T.;Shinohara, K.; Watanabe, M.; Okuyama, S.; Nakazato, A.; Nukada, T. Amino acid residues in the transmembrane domain of the type 1 sigma receptor critical for ligand binding. *Febs Letters* **1999**, 445(1), 19-22.
80. Seth, P.; Ganapathy, M. E.; Conway, S. J.; Bridges, C. D.; Smith, S. B.; Casellas, P.; Ganapathy, V. Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand binding domain of the receptor. *Biochemical and Biophysical*

Acta. **2001**, 1540, 59-67.

81. Stone, J. M.; Arstad, E.; Erlandsson, K.; Waterhouse, R. N.; Ell, P. J.; Pilowsky, L. S. [123I]TPCNE--a novel SPET tracer for the sigma-1 receptor: first human studies and in vivo Haloperidol challenge. *Synapse* **2006**, 60(2), 109-117.
82. Bouchard, P.; Quirion, R. [³H]1,3-di(2-tolyl) guanidine and [³H](+)pentazocine binding sites in the rat brain: autoradiographic visualization of the putative sigma1 and sigma2 receptor subtypes. *Neuroscience* **1997**, 76(2), 467-477.
83. McLean, S.; Weber, E. Autoradiographic visualization of haloperidol-sensitive sigma receptors in Guinea-pig brain. *Neuroscience* **1988**, 25(1), 259-269.
84. Campana, G.; Bucolo, C.; Murari, G.; Spampinato, S. Ocular hypotensive action of topical flunarizine in the rabbit: role of σ_1 recognition sites. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, 303(3), 1086-1094.
85. Bermack, J. E.; Debonnel, G. The role of sigma receptors in depression. *Journal of Pharmacological Sciences* **2005**, 97(3), 317-336.
86. Mtchedlishvili, Z.; Kapur, J. A presynaptic action of the neurosteroid pregnenolone sulfate on GABAergic synaptic transmission. *Molecular Pharmacology* **2003**, 64(4), 857-864.
87. Maurice, T.; Martin-Fardon, R.; Romieu, P.; Matsumoto, R. R. Sigma 1 receptor antagonists represent a new strategy against cocaine addiction and toxicity. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* **2002**, 26(4), 499-527.
88. Martina, M.; Turcotte, M.E.B.; Halman, S.; Bregeron, R. The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *J. Physiol.* **2007**, 578, 143-157.
89. Su, T.P.; Hayashi, T.; Maurice, T.; Buch, S.; Ruoho, A.E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organell e signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, 557–566.
90. Hayashi, T.; Tsai, S.Y.; Mori, T.; Fujimoto, M.; Su, T.P. Targeting ligand-operated chaperone sigma-1 receptors in the treatment of neuropsychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets* **2011**, 15,557–577
91. Matsumoto, R.R; Bowen, W.D; Su T.P. Sigma receptors-Chemistry Cell Biology and Clinical Implications. Springer, **2007**.
92. Brune, S.; Schepman, D.; Klempnauer, K.H.; Marson, D.; Dal Col, V.; Laurini, E.; Fermeglia, M.; Wünc, B.; Pricl, S. The Sigma Enigma: *In Vitro/in Silico* Site-Directed Mutagenesis Studies Unveil σ_1 Receptor Ligand Binding. *Biochemistry* **2014**, 53, 2993-3003.
93. Hellewell, S. B.; Bruce, A.; Feinstein, G.; Orringer, J.; Williams, W.; Bowen W. D. Rat liver and kidney contain high densities of Sigma 1 and Sigma 2 receptors: Characterization by ligand

- binding and photoaffinity labeling. *European Journal of Pharmacology* **1994**, 268(1), 9-18.
94. Dumont, S.; Lemaire, M. Interaction of 1,3-di(2-[5-3H]tolyl)guanidine with Sigma 2 binding sites in rat heart membrane preparations. *European Journal Pharmacology* **1991**, 209, 245-248.
 95. Zeng, C.; Vangveravong, S.; Xu, J.; Chang, K. C.; Hotchkiss, R. S.; Wheeler, K. T.; Shen, D.; Zhuang, Z. P.; Kung, H. F.; Mach, R. H. Subcellular localization of Sigma-2 receptors in Breast Cancer cells using Two-Photon and Confocal Microscopy. *Cancer Research* **2007**, 67, 6708–6716.
 96. Xu, J.; Zeng, C.; Chu, W.; Pan, F.; Rothfuss, J. M.; Zhang, F.; Tu, Z.; Zhou, D.; Zeng, D.; Vangveravong, S.; Johnston, F.; Spitzer, D.; Chang, K. C.; Hotchkiss, R. S.; Hawkins, W. G.; Wheeler, K. T.; Mach, R. H. Identification of the PGRMC1 Protein Complex as the Putative Sigma-2 receptor Binding Site. *Nature Communications* **2011**, 2, 380.
 97. Vilner, B. J.; John, C. S.; Bowen, W. D. Sigma-1 and Sigma-2 Receptors Are Expressed in a Wide Variety of Human and Rodent Tumor Cell Lines. *Cancer Res.* **1995**, 55, 408–413.
 98. John, C. S.; Vilner, B. J.; Gulden, M. E.; Efange, S. M.; Langason, R. B.; Moody, T. W.; Bowen, W. D. Synthesis and Pharmacological Characterization of 4-[125I]-N-(N-Benzylpiperidin-4-yl)-4-Iodobenzamide: A High Affinity Sigma Receptor Ligand for Potential Imaging of Breast Cancer. *Cancer Res.* **1995**, 55, 3022–3027.
 99. Shiue, C.; Shiue, G. G.; Benard, F.; Visonneau, S.; Santoli, D.; Alavi, A. A. N-(n-Benzylpiperidin-4-yl)-2-[18F]fluorobenzamide: A Potential Ligand for PET Imaging of Breast Cancer. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, 27, 763–767.
 100. Choi, S. R.; Yang, B.; Plössl, K.; Chumpradit, S.; Wey, S. P.; Acton, P. D.; Wheeler, K.; Mach, R. H.; Kung, H. F. Development of a Tc-99m Labeled Sigma-2 Receptor-Specific Ligand as a Potential Breast Tumor Imaging Agent. *Nucl. Med. Biol.* **2001**, 28, 657–666.
 101. Ramakrishnan, N. K.; Rybczynska, A. A.; Visser, A. K. D.; Marosi, K.; Nyakas, C. J.; Kwizera, C.; Sijbesma, J. W. A.; Elsinga, P. H.; Ishiwata, K.; Pruijm, J.; Dierckx, R. A. J. O.; Van Waarde, A. Small-Animal PET with a Σ -Ligand, ¹¹C-SA4503, Detects Spontaneous Pituitary Tumors in Aged Rats. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **2013**, 54, 1377–1383.
 102. Mach, R. H.; Smith, C. R.; Al-Nabulsi, I.; Whirrett, B. R.; Childers, S. R.; Wheeler, K. T. Sigma 2 Receptors as Potential Biomarkers of Proliferation in Breast Cancer. *Cancer Res.* **1997**, 57, 156–161.
 103. Guitart, X.; Codony, X.; Monroy, X. Sigma Receptors: Biology and Therapeutic Potential. *Psychopharmacology* **2004**, 174, 301–319.
 104. Vilner, B. J.; De Costa, B. R.; Bowen, W. D. Cytotoxic Effects of Sigma Ligands: Sigma Receptor-Mediated Alterations in Cellular Morphology and Viability. *J. Neurosci. Off. J. Soc.*

- Neurosci. **1995**, 15, 117–134.
105. Van Waarde, A.; Rybczynska, A. A.; Ramakrishnan, N.; Ishiwata, K.; Elsinga, P. H.; Dierckx, R. A. J. O. Sigma Receptors in Oncology: Therapeutic and Diagnostic Applications of Sigma Ligands. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, 16, 3519–3537.
 106. Česen, M. H.; Repnik, U.; Turk, V.; Turk, B. Siramesine Triggers Cell Death through Destabilisation of Mitochondria, but Not Lysosomes. *Cell Death Dis* **2013**, 4.
 107. Shoghi, K. I.; Xu, J.; Su, Y.; He, J.; Rowland, D.; Yan, Y.; Garbow, J. R.; Tu, Z.; Jones, L. A.; Higashikubo, R.; Wheeler, K. T.; Lubet, R. A.; Mach, R. H.; You, M. Quantitative Receptor-Based Imaging of Tumor Proliferation with the Sigma-2 Ligand [(18)F]ISO-1. *PloS one* **2013**, 8.
 108. Hornick, J. R.; Xu, J.; Vangveravong, S.; Tu, Z.; Mitchem, J. B.; Spitzer, D.; Goedegebuure, P.; Mach, R. H.; Hawkins, W. G. The Novel Sigma-2 Receptor Ligand SW43 Stabilizes Pancreas Cancer Progression in Combination with Gemcitabine. *Mol. Cancer* **2010**, 9.
 109. Kashiwagi, H.; McDunn, J. E.; Simon, P. O.; Goedegebuure, P. S.; Xu, J.; Jones, L.; Chang, K.; Johnston, F.; Trinkaus, K.; Hotchkiss, R. S.; Mach, R. H.; Hawkins, W. G. Selective Sigma-2 Ligands Preferentially Bind to Pancreatic Adenocarcinomas: Applications in Diagnostic Imaging and Therapy. *Mol. Cancer* **2007**, 6.
 110. Thienhaus, O.; Cole, B.E. Classification of Pain. In: Weiner RS. *Pain Management: a Practical Guide for Clinicians*, 6th ed. New York, NY, CRC Press, **2002**.
 111. Loeser, J.D.; Butler, S.H.; Chapman, R.C.; Turk, D.C. *Bonica's management of pain*, III ed. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, **2001**.
 112. Mishra, S.; Bhatnagar, S. Breakthrough Cancer Pain: Review of Prevalence, Characteristics and Management. *Indian Journal of Palliative Care*, **2009**, 15, 14–18.
 113. Svendsen, K.B.; Andersen, S.; Arnason, S. Breakthrough Pain in Malignant and Non-malignant Diseases: A Review of Prevalence, Characteristics and Mechanisms. *European Journal of Pain*, **2005**, 9, 195–206.
 114. WHO World Health Organization. *Guidelines on the Pharmacological Treatment of Persisting Pain in Children with Medical Illnesses*. Fondazione IRCCS, Istituto Nazionale dei Tumori **2014**.
 115. Haanpää, M.; Treede, F.D. Diagnosis and Classification of Neuropathic Pain. *IASP Clinical Updates*, **2010**, 18, 1–6.
 116. Ballantyne, J.C.; Cousins, M.J.; Giamberardino, M.A.; Jamison, R.N.; McGrath, P.A.; Rajagopal, M.R.; Smith, M.T.; Sommer, C.; Wittink, H.M. Diagnosis and Classification of Neuropathic Pain. *IASP*, **2010**, 18 (7), 1-6.

117. International Association for the Study of Pain (IASP). www.iasp-pain.org
118. Treede, R.D.; Jensen, T.S.; Campbell, J.N.; Cruccu, G.; Dostrovsky, J.O.; Griffi, J.W.; Hansson, P.; Hughes, R.; Nurmikko, T.; Serra, J. Redefinition of Neuropathic Pain and a Grading System for Clinical Use: Consensus Statement on Clinical and Research Diagnostic Criteria. *Neurology*, **2008**, 70, 1630–1635.
119. Carbone, E.; Cicirata, F.; Aicardi, G. *Fisiologia: dalle molecole ai sistemi integrati – EdiSES*, **2009**.
120. Attal, N.; Fermanian, C.; Fermanian, J.; Lanteri-Minet, M.; Alchaar, H.; Bouhassira, D. Neuropathic Pain: are there distinct subtypes depending on the aetiology or anatomical lesion. *Pain*, **2008**;138, 343–353.
121. Woolf, C.J.; Mannion, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet*, **1999**, 353, 1959–1964.
122. Descalzi, G.; Ikegami, D.; Ushijima, T.; Nestle, E.J.; Zachariou, V.; Narita, M. Epigenetic mechanisms of chronic pain. *Elsevier Ltd*, **2015**, 38(4), 237-246.
123. Poobalan, A.S.; Bruce, J.; Smith, W.C.; King, P.M.; Krukowski, Z.H.; Chambers, W.A. A Review of Chronic Pain after Inguinal Herniorrhaphy. *Clin J Pain* **2003**, 19, 48–54.
124. Schmauss, C.; Yaksh, T.L. In vivo studies on spinal opiate receptor systems mediating antinociception. II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta, and kappa receptors with visceral chemical and cutaneous thermal stimuli in the rat. *J. Pharmacol Exp*, **1984**, 228, 1-12.
125. Cohen, S.P.; Mao, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ Clinical Research Ed.*, **2014**, 348, 7656.
126. Coderre, T.J.; Vaccarino, A.L.; Meizack, R. Contribution of central neural plasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*, **1993**, 52, 259-285.
127. Woolf, C.J.; Shortland, P.; Reynolds, M.; Ridings, J.; Doubell, T.; Coggeshall, R.E. Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the dorsal horn following peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.* **1995**, 360, 121-134.
128. Kandel, E.; Schwartz, J.K.; Jessell, T.M.; Siegelbaum, S.; Hudspeth, A.J. *Principi di Neuroscienze: Il Dolore*. C.E.Ambrosiana, **2014**, 24, 530-553.
129. Bridges, D.; Thompson, S. W. N.; Rice, A.S.C. Mechanisms of Neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia*, **2001**, 87(1), 12-26.
130. Jensen, T.S.; Baron, R.; Haanpää, M. A new Definition of Neuropathic Pain. *Pain* **2011**, 152, 2204–05.
131. Von Hehn, C.A.; Baron, R.; Woolf, C.J. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to

- reveal Neural Mechanisms. *Neuron* **2012**, 73, 638–652.
132. Jensen, T.S.; Finnerup, N.B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet Neurology*, **2014**, 13, 924–35.
 133. Kaasa, T.; Romundstad, L.; Roald, H.; Skolleborg, K.; Stubhaug, A. Hyperesthesia one year after Breast Augmentation Surgery Increases the Odds for Persisting Pain at four years: A prospective four-year follow-up study. *Scand. J. Pain*, **2010**, 1, 75–81.
 134. Max, M.B. Towards Physiologically Based Treatment of Patients with Neuropathic Pain. *Pain* **1990**, 42, 131–137.
 135. International Association for the Study of Pain Taxonomy. **2011**: <http://www.iasp-pain.org>.
 136. Woolf, C.J.; Salter, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, **2000**, 288, 1765–1768.
 137. Basbaum, A.I.; Bautista, D.M.; Scherrer, G.; Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **2009**, 139, 267–284.
 138. Latremoliere, A.; Woolf, C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* **2009**, 10, 895–926.
 139. Paice, J.A. Chronic treatment-related pain in cancer survivors. *Pain* **2011**, 152, 84-89.
 140. Park, S.B.; Krishnan, A.V.; Lin, C.S.; Goldstein, D.; Friedlander, M.; Kiernan, M.C. Mechanisms underlying chemotherapy-induced neurotoxicity and the potential for neuroprotective strategies. *Curr Med Chem* **2008**, 15, 3081-3094.
 141. Sul, J.K.; Deangelis, L.M. Neurologic complications of Cancer Chemotherapy. *Semin Oncol* **2006**, 33, 324-332.
 142. Argyriou, A.A.; Koltzenburg, M.; Polychronopoulos, P.; Papapetropoulos, S.; Kalofonos, H.P. Peripheral nerve damage associated with administration of Taxanes in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **2008**, 66, 218-228.
 143. Dougherty, P.M.; Cata, J.P.; Cordella, J.V.; Burton, A.; Weng, H.R. Taxol-induced sensory disturbance is characterized by preferential impairment of myelinated fiber function in cancer patients. *Pain* **2004**, 109, 132-142.
 144. Jung, B.F.; Herrmann, D.; Griggs, J.; Oaklander, A.L.; Dworkin, R.H. Neuropathic pain associated with nonsurgical treatment of breast cancer. *Pain* **2005**, 118, 10-14.
 145. Sherrington, C.S. The integrative action of the nervous system. Scribner, N.Y., **1906**.
 146. Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanism of nociception. *Nature Rev.* **2001**, 413, 403-410.
 147. Villanueva, L.; Bernard, J.F. The multiplicity of ascending pain pathways. *Handbook of behavioural state control, cellular and molecular mechanism*. Boca Raton: CRC Press, **1999**,

569-585.

148. Melzack, R.; Wall, P.D. Acute pain in emergency clinic: Latency of onset and descriptor patterns related to different injuries. *Pain*, **1982**, 14, 33-43.
149. Basbaum, A.I.; Fields, H.L. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: further studies on the anatomy of pain modulation. *J Comp Neurol*. **1979**, 187, 513-531.
150. Behbehani, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Progress in Neurobiology*, **1995**, 46, 575-605.
151. Ronsisvalle, G.; Pappalardo, M.; Pasquinucci, L.; Prezzavento, O. I recettori oppioidi. *CLUEB* 16 ed. **2001**, 331.
152. Terenius, L. Stereospecific interaction between narcotic analgesic and synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol*. **1973**, 32, 317-320.
153. Pert, C.B.; Snyder, S.H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, **1973**, 770, 2243-2247.
154. Waldhoer, M.; Barlett, S.E.; Whistler, J.L. Opioid receptor. *Annu Rev Biochem*, **2004**, 73, 953-990.
155. Hughes, J.; Smith, T.W.; Kosterlitz, H.W. Identification of two related pentapeptide from brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, **1975**, 258, 577-579.
156. Janecka, A.; Fichua, J.; Janecki, T. Opiate receptor and their ligands. *Curr. Med. Chem*, **2004**, 4, 1-17.
157. Lemke, T.L.; Williams, D.A.; Roche, V.T.; Zito, S.W. Analgesici oppioidi. *Foye's Principi di Chimica Farmaceutica*. *Piccin* **2014**, 693-731.
158. Akil, H.; Watson, S.J.; Young, E. Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci*. **1984**, 7, 233-255.
159. Goldstein, A.; Tachibana, S.; Lowney, L.I. Procaine pituitary Dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptapeptide. *Proc Natl Acad. USA* **1979**, 76, 6666-6670.
160. Li, C.H.; Lemaire, S.; Yamashiro, D. The synthesis and opiate activity of β -endorphin. *Biochem Bioph Rev Commun*. **1976**, 71, 19-25.
161. Zadina, J.E.; Hackler, L.; Ge, L.S. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature*, **1997**, 380, 499-502.
162. Gilbert, P.E; Martin, W.E. The Effect of Morphine and Morphine-like Drugs in the Nondependent, Morphine Dependent, and Cyclazocine-dependent, Chronic Spinal Dog. *J Pharmacol Exp Ther*, **1976**, 198, 66-82.
163. Lord, J.A.H.; Waterfield, A.A.; Hughes, J. Endogenous Opioid Peptides: Multiple Agonist and

- Receptor. *Nature* **1977**, 267, 495-499.
164. Satoh, M.; Minami, M. Molecular Pharmacology of the Opioid Receptor. *Pharmacol Ther*, **1995**, 68, 343-364.
 165. Dhawan, B.N.; Cesselin, R.; Raghbir, R. Classification of opioid receptor. *International Union of Pharmacology XII. Pharmacol Rev*, **1996**, 48, 567-592.
 166. Childers, S.R. Opioid Receptor-coupled Second Messengers System. *Life Sci*, **1991**, 48, 1991-2003.
 167. Connor, M.; Christie, M.D. Opioid Receptor Signaling Mechanism. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **1999**, 26, 493-499.
 168. Svoboda, K.R.; Lupica, C.R. Opioid inhibition of Hippocampal Interneurons via Modulation of Potassium and Hyperpolarization-activated cation (I_h) Currents. *J. Neurosci* **1998**, 18, 7084-7098.
 169. Traynor J., Elliot J. Delta-Opioid Receptor Subtypes and Cross-talk with mu-receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* **1993**, 14, 84-85.
 170. Pan, L.; Xu, J. Identification and Characterization of six New Alternatively Spliced Variant of the Human mu Opioid Receptor Gene Oprm. *Neuroscience*, **2005**, 133, 209-220.
 171. Berque-Bestel, I.; Lezoualc'h, F.; Jockers, R. Bivalent Ligands as Specific Pharmacological Tools for G Protein-Coupled Receptor Dimers. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2008**, 5 (4), 312-318.
 172. Shimohigashi Y.; Costa, T.; Chen, H.C.; Rodbard, D. Dimeric Tetrapeptide Enkephalins Display Extraordinary Selectivity for the Delta Opiate Receptor. *Nature*, **1982**, 297, 333-335.
 173. Kieffer, B.L. Opioid: first lessons from Knockout mice. *Trends Pharmacol Sci.* **1999**, 20 (1), 19-25.
 174. Jiang, Q.; Takemori, A.E.; Sultana, M. Differential antagonism of opioid δ antinociception by [D Ala² Leu⁵ Cys⁶]-enkephalin and naltrindole 5I-isothiocyanate: Evidence for δ receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **1991**, 257, 1069-1975.
 175. Vergura R.; Balboni, G.; Spagnolo, B.; Gavioli, E.; Lambert, D.G; McDonald, J.; Trapella, C.; Lazarus, L.H.; Regoli, D.; Guerrini, R.; Salvadori, S.; Caló, G. .Anxiolytic- and antidepressant-like activities of H-Dmt-Tic-NH-CH(CH₂-COOH)-Bid (UFP-512), a novel selective delta opioid receptor agonist. *Peptides*, **2008**, 29, 93-103.
 176. James, I.F.; Goldstein, A. Site-directed alkylation of multiple opioid receptor. I.Binding selectivity. *Mol Pharmacol*, **1984**, 25, 337-342.
 177. Gacel, G.; Fournie-Zalushi, M.L.; Roques, B.P. D-Tyr-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr a highly preferential ligands for δ -opiate receptor. *FEBS Lett.* **1980**, 118, 245-247.

178. Mosberg, H.I.; Hurst, R.; Hruby, V.J. Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward δ opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1983**, 80, 5871-5874.
179. Portoghese, P.S.; Sultana, M.; Takemori, A.E. Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide δ opioid receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. **1988**, 146, 185-186.
180. Takemori, A.E.; Sultana, M.; Nagase, H. Agonist and antagonist activities of ligand derived from Naltrexone and Oxymorphone. *Life Sci*. **1992**, 149, 1-5.
181. Rothman, R.B.; Bykov, V.; De Costa, B.R. Evidence for four opioid κ binding sites in guinea pig brain. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1990**, 328, 9-12.
182. Choi, H.; Murray T.F.; De Lander, G.E. N-terminal alkylated derivatives of [D-Pro10] dynorphin A are highly selective for κ opioid receptors. *J Med Chem*. **1992**, 35, 4638- 4639.
183. Lung, F.D.T.; Meyer, J.P.; Li, G. Highly κ -receptor selective dynorphin A analogues with modifications in position 3 of dynorphin A (1-11)-NH₂. *J Med Chem*. **1995**, 38, 585-586.
184. Szmuszkowicz, J.; Von Voigtlander, P.F. Benzeneacetamide amines: structurally novel non- μ opioids. *J Med Chem*. **1982**, 25, 1125-1126.
185. Barber, A.; Bartoszyk, G.D.; Bender, H.M. A pharmacological profile of the novel, peripherally selective κ -opioid receptor agonist, EDM 61753. *Br J Pharmacol*. **1994**, 113, 843-851.
186. Portoghese, P.S.; Lipkowski, A.W.; Takemori, A.E. Bimorphinans as highly selective, potent κ opioid receptor antagonist. *J Med Chem*. **1987**, 30, 238-239.
187. Golembiewski, J.; Rakic, A.M. Opioids. *J Perianesth Nurs*, **2010**, 25, 258-260.
188. Bruijnzeel, A.W. Kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function. *Brain Res Rev*, **2009**, 62, 127-146.
189. Przewlocki, R.; Przewlocka, B. Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol*, **2001**, 429, 79-91.
190. Bekhit, M.H. Opioid-induced hyperalgesia and tolerance. *Am J Ther*, **2010**, 17, 498-510.
191. Ballantyne, J.C.; Shin, N.S. Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence. *Clin J Pain*, **2008**, 24, 469-478.
192. Benyamin, R.; Trescot, A.M.; Datta, S.; Buenaventura, R.; Adlaka, R.; Sehgal, N.; Glaser, S.E.; Vallejo, R. Opioid complications and side effects. *Pain Physician*, **2008**, 11, 105-120.
193. Grecksch, G.; Bartzsch, K.; Widera, A.; Becker, A.; Hollt, V.; Koch, T. Development of tolerance and sensitization to different opioid agonists in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **2006**, 186, 177-184.
194. Liu, J.G.; Anand, K.J. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev*, **2001**, 38, 1-19.
195. Manchikanti, L.; Fellows, B.; Ailinani, H.; Pampati, V. Therapeutic use, abuse, and nonmedical use of opioids: a ten-year perspective. *Pain Physician*, **2010**, 13, 401-435.

196. Rashid, M.H.; Inoue, M.; Toda, K.; Ueda, H. Loss of peripheral morphine analgesia contributes to the reduced effectiveness of systemic morphine in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther*, **2004**, 309, 380-387.
197. Takasaki, I.; Nojima, H.; Shiraki, K.; Kuraishi, Y. Specific down-regulation of spinal mu-opioid receptor and reduced analgesic effects of morphine in mice with postherpetic pain. *Eur J Pharmacol*, **2006**, 550, 62-67.
198. Yamamoto, J.; Kawamata, T.; Niiyama, Y.; Omote, K.; Namiki, A. Down-regulation of mu opioid receptor expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons in a murine model of bone cancer pain. *Neuroscience*. **2008**, 151, 843-853.
199. Kohno, T.; Ji, R.R.; Ito, N.; Allchorne, A.J.; Befort, K.; Karchewski, L.A. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain*, **2005**, 117, 77-87.
200. Lacroix-Fralish, M.L.; Austin, J.S.; Zheng, F.Y.; Levitin, D.J.; Mogil, J.S. Patterns of pain: meta-analysis of microarray studies of pain. *Pain*, **2011**, 152, 1888–1898.
201. Maratou, K.; Wallace, V.C.; Hasnie, F.S.; Okuse, K.; Hosseini, R.; Jina, N.; Blackbeard, J.; Pheby, T.; Orenge, C.; Dickenson, A.H.; McMahon, S.B.; Rice, A.S. Comparison of dorsal root ganglion gene expression in rat models of traumatic and HIV-associated neuropathic pain. *Eur J Pain*, **2009**, 13, 387–98.
202. Minucci, S.; Pelicci, G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Publishing Group* **2006**, 6, 38-51.
203. Nelson, E.D.; Monteggia, L.M. Epigenetics in the mature mammalian brain: effects on behavior and synaptic transmission. *Neurobiol. Learn. Mem*, **2011**, 96, 53–60.
204. Denk, F.; Huang, W.; Sidders, B.; Bithell, A.; Crow, M.; Grist, J.; Sharma, S.; Ziemek, D.; Rice, A.; Buckley, N.; McMahon, S. HDAC inhibitors attenuate the development of hypersensitivity in models of neuropathic pain. *Iasp Pain*, **2013**, 154, 1668–1679.
205. Zhang, Z. Epigenetic suppression of GAD65 expression mediates persistent pain. *Nat. Med*, **2011**, 17, 1448–1455.
206. Descalzi, G.; Ikegami, D.; Ushijima, T.; Nestler, E.; Zachariou, V.; Narita, M. Epigenetic mechanisms of chronic pain. *Trends in Neurosciences*, **2015**, 38 (4), 237-246.
207. Chahwan, R.; Wontakal, S. N.; Roa S. The multidimensional nature of epigenetic information and its role in disease. *Discovery Medicine*, **2011**, 11(58), 233-43.
208. Luger, K.; Mäder, A. W.; Richmond, R. K.; Sargent, D. F.; Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **1997**, 389 (6648), 251-60.
209. Monneret, C. Histone deacetylase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, 40, 1-13.

210. Bjerling P. Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22, 2170-2181.
211. Capasso, K.; Manners, M.; Quershi, R.; Tian, Y.; Gao, R.; Hu, H.; Barrett, J.; Sacan, A.; Ajit, S. Effect of Histone Deacetylase Inhibitor JNJ-26481585 in Pain. *J Mol Neurosci*, **2015**, 55, 570–578.
212. Zammataro, M.; Sortino, M.; Parenti, C.; Gereau, R.; Chiechio, S. HDAC and HAT inhibitors differently affect analgesia mediated by group II metabotropic glutamate receptors. *Molecular Pain* **2014**, 10, 1-6.
213. Struhl, K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Development* **1998**, 12 (5), 599-606.
214. Davis, P. K.; Brackmann, R. K. Chromatin remodeling and cancer. *Cancer Biology & Therapy* **2003**, 2 (1), 22-9.
215. Ooi, L.; Wood, I.C. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nat Rev Genet*, **2007**, 8, 544-554.
216. Dovey, O.M.; Foster, C.T.; Cowley, S.M. Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107(18), 8242-8247.
217. Jacob, C.; Christen, C.N.; Pereira, J.A.; Somandin, C.; Baggiolini, A.; Lötscher P.; Özçelik, M.; Tricaud, N.; Meijer, D.; Yamaguchi, T.; Matthias, P.; Suter, U. HDAC1 and HDAC2 control the transcriptional program of myelination and the survival of Schwann cells. *Nature Neuroscience* **2011**, 14(4), 429-36.
218. Lagger, G.; O'Carroll, D.; Rembold, M.; Khier, H.; Tischler, J.; Weitzer, G.; Schuettengruber, B.; Hauser, C.; Brunmeir, R.; Jenuwein, T.; Seiser, C. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO Journal* **2002**, 21(11), 2672-2681.
219. Montgomery, R.L.; Davis, C.A.; Potthoff, M.J.; Haberland, M.; Fielitz, J.; Qi, X.; Hill, J.A.; Richardson, J.A.; Olson, E.N. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Development*, **2007**, 21(14), 1790-1802.
220. Bolden, J.E; Peart, M.J.; Johnstone, R.W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, **2006**, 5, 769-784.
221. Bolden, J.E.; Peart, M.J.; Johnstone, R.W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, **2006**, 5, 769–84.
222. Maeda, T.; Towatari, M.; Kosugi, H.; Saito, H. Up-regulation of costimulatory/ adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood* **2000**, 96,

3847–56.

223. Kouzarides, T. Histone Acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1999**, 9, 40-48.
224. Baylin, S. B.; Ohm, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer: a mechanism for early oncogenic pathway addiction. *Nature Rev. Cancer* **2006**, 6, 107–116.
225. Marks, P. A.; Breslow, R. Dimethyl sulfoxide to Vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nature Biotechnology* **2007**, 25(1), 84-90.
226. Campas-Moya, C. Romidepsin for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Drugs Today* **2009**, 45(11), 787-795.
227. Chung, Y.L.; Lee, M.Y.; Wang, A.J.; Yao, L.F. A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mol Ther* **2013**, 8, 707-717.
228. Guan, J.S.; Haggarty, S.J.; Giacometti, E.; Dannenberg, J.H.; Joseph, N.; Gao, J.; Nieland, T.J.F.; Zhou, Y.; Wang, X.; Mazitschek, R.; Bradner, J.E.; DePinho, R.A.; Jaenisch, R.; Tsai, L.H. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* **2009**, 459, 55–60.
229. Denk, F.; McMahon, S.B. Chronic pain: emerging evidence for the involvement of epigenetics. *Neuron* **2012**, 73, 435–444.
230. Kukkar, A.; Singh, N.; Singh, A. Attenuation of neuropathic pain by sodium butyrate in an experimental model of chronic constriction injury in rats. *Journal of the Formosan Medical Association*, **2014**, 113, 921-928.
231. Miller, T.A.; Bitter, D.J.; Belvedere, S. Histone deacetylase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5097-5116.
232. Rodriguez-Menendez, V.; Tremolizzo, L.; Cavaletti, G. Targeting cancer and neuropathy with histone deacetylase inhibitors: two birds with one stone? *Curr Cancer Drug Targets* **2008**, 8, 266-274.
233. Choudhary, S.K.; Margolis, D.M. Curing HIV: Pharmacologic approaches to target HIV-1 latency. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology* **2011**, 51, 397-418.
234. Shuttleworth, S.J.; Bailey, S.G.; Townsend, P.A. Histone Deacetylase inhibitors: new promise in the treatment of immune and inflammatory diseases. *Current Drug Targets* **2010**, 11(11), 1430-1438.
235. Geranton, S.M. Targeting epigenetic mechanisms for pain relief. *Curr Opin Pharmacol* **2012**, 12, 35–41.
236. Matsushita, Y.; Araki, K.; Omotuyi, O.; Mukae, T.; Ueda, H. HDAC inhibitors restore C-fibre

- sensitivity in experimental neuropathic pain model. *Br J Pharmacol* **2013**, 170(5), 991–998.
237. Huang, W.; Calvo, M.; Karu, K.; Olausen, H.R.; Bathgate, G.; Okuse, K.; Bennett, D.L.; Rice, A.S. A clinically relevant rodent model of HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. *Pain* **2013**, 154, 560-575.
238. Leoni, F.; Fossati, G.; Lewis, E.C.; Lee, J.K.; Porro, G.; Pagani, P. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of pro-inflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Mol Med* **2005**, 11, 1-15.
239. Leung, L.; Cahill, C.M. TNF-alpha and neuropathic pain; a review. *J Neuroinflammation* **2010**, 7, 27.
240. Munro, G.; Ahring, P.K.; Mirza, N.R. Developing analgesics by enhancing spinal inhibition after injury: GABAA receptor subtypes as novel targets. *Trends Pharmacol Sci* **2009**, 30, 453-459.
241. Stück, E.D.; Christensen, R.N.; Huie, J.R.; Tovar, C.A.; Miller, B.A.; Nout, Y.S. Tumor necrosis factor alpha mediates GABA (A) receptor trafficking to the plasma membrane of spinal cord neurons in vivo. *Neural Plast* **2012**, 2012, 261345.
242. Uchida, H.; Matsushita, Y.; Araki, K.; Mukae, T.; Ueda, H. Histone deacetylase inhibitors relieve morphine resistance in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Journal of Pharmacological Sciences* **2015**, 128, 208-211.
243. Chien, C.C.; Pasternak, G.W. Sigma antagonists potentiate opioid analgesia in rats. *Neurosci Lett*. **1995**, 190, 137–139.
244. Díaz, J.L.; Cuberes, R.; Berrocal, J.; Contijoch, M.; Christmann, U.; Fernández, A.; Port, A.; Holenz, J.; Buschmann, H.; Laggner, C.; Serafini, M.T.; Burgueño, J.; Zamanillo, D.; Merlos, M.; Vela, J.M.; Almansa, C. Synthesis and biological evaluation of the 1-arylpyrazole class of σ_1 receptor antagonists: identification of 4-{2-[5-methyl-1-(naphthalen-2-yl)-1H-pyrazol-3-yloxy]ethyl} morpholine (S1RA,E-52862). *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 8211–8224.
245. Vela, J.M.; Abadias, M.; Escriche, M.; Sust, M.; Farrán, R.; Encabo, M.; Vidal, A.; Romero, L.; Zamanillo, D.; Encina, G.; Plata, C.R. Characterization of a New Selective Sigma-1 Receptor Antagonist (S1RA) that Inhibits Neuropathic Pain and Potentiates Opioid Analgesia—From Rodents to Human. *BENZONSYMPO-SIUM Copenhagen*, **2010**, October 4–7.
246. Entrena, J.M.; Cobos, E.J.; Nieto, F.R.; Cendán, C.M.; Gris, G.; Del Pozo, E.; Zamanillo, D.; Baeyens, J.M. Sigma-1 receptors are essential for capsaicin-induced mechanical hypersensitivity: studies with selective sigma-1 ligands and sigma-1 knockout mice. *Pain*, **2009**, 143, 252–261.
247. Cobos, E.J.; Entrena, J.M.; Nieto, F.R.; Cendan, C.M.; DelPozo, E. *Pharmacology and*

- therapeutic potential of sigma-1 receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* **2008**, 6, 344–366.
248. Zamanillo, D.; Romero, L.; Merlos, M.; Vela, M.J. Sigma 1 receptor: A new therapeutic for pain. *European Journal of Pharmacology*, **2013**, 716, 78–93.
249. Marrazzo, A.; Cobos, E.; Parenti, C.; Aricò, G.; Marrazzo, G.; Ronsisvalle, S.; Pasquinucci, L.; Prezzavento, O.; Colabufo, N.; Contino, M.; Gonzalez, L.; Scoto, G.; Ronsisvalle, G. Novel Potent and Selective σ Ligands: Evaluation of Their Agonist and Antagonist Properties. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3669–3673.
250. Parenti, C.; Marrazzo, A.; Arico, G.; Parenti, R.; Pasquinucci, L.; Ronsisvalle, S.; Ronsisvalle, G.; Scoto, G. The antagonistic effect of the sigma 1 receptor ligand (+)-MR200 on persistent pain induced by inflammation. *Inflamm. Res.* **2014**, 63, 231–237.
251. Parenti, C.; Marrazzo, A.; Aricò, G.; Cantarella, G.; Prezzavento, O.; Ronsisvalle, S.; Scoto, G.; Ronsisvalle, G. Effects of a Selective Sigma 1 Antagonist Compound on Inflammatory Pain. *Inflammation*, **2014**, 37 (1), 261-266.
252. Kim, F.J.; Kovalyshyn, I.; Burgman, M.; Neilan, C.; Chien, C.C.; Pasternak, G.W. Sigma 1 receptor modulation of G-protein-coupled receptor signaling: potentiation of opioid transduction independent from receptor binding. *Mol.Pharmacol.* **2010**, 77,695–703.
253. Entrena, J.; Cobos, E.; Nieto, F.; Baeyens, J.; Del Pozo, E. Antagonism by haloperidol and its metabolites of mechanical hypersensitivity induced by intraplantar capsaicin in mice: role of sigma-1 receptors. *Psychopharmacology*, **2009**, 205, 21–33.
254. Tejada, M.; García, A.; Entrena, J.; Perazzoli, G.; Baeyens, J.; Cobos, E. Sigma-1 receptor inhibition reverses acute inflammatory hyperalgesia in mice: role of peripheral sigma-1 receptors. *Psychopharmacology*, **2014**, 231:3855–3869.
255. Su, T.P.; Hayashi, T.; Maurice, T.; Buch, S.; Ruoho, A.E. The sigma-1receptor chaperone as an inter-organell e signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, 31, 557–566.
256. NIDA Research Monograph Series, Problems of Drug Dependence **1988**, 443-445.