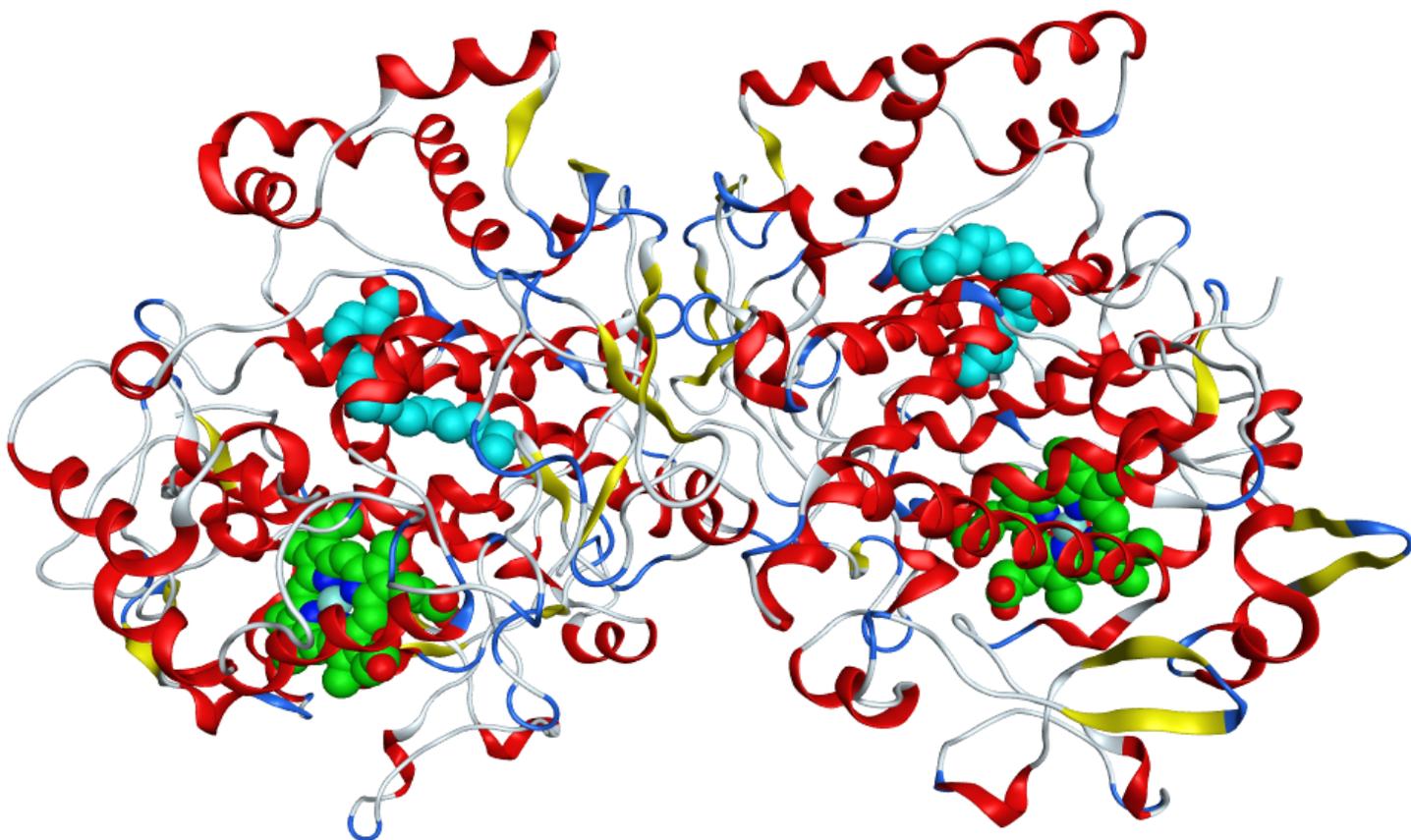




ESAME DI STATO  
2013/2014



# **CICLOOSSIGENASI E FARMACI ANTI-INFIAMMATORI NON STEROIDEI**



Alunno: Daniele Poletto

# INDICE

## **1 - Introduzione 3**

- 1.1 - Farmaci anti-infiammatori 3
- 1.2 - Cicloossigenasi e prostaglandine 4

## **2 - Cicloossigenasi 5**

- 2.1 - Isoforme 5
- 2.2 - Sequenza primaria dell'enzima 7
- 2.3 - Peptide segnalatore 8
- 2.4 - Dominio di dimerizzazione 8
- 2.5 - Dominio di legame alla membrana 9
- 2.6 - Dominio catalitico 10
  - 2.6.1 - Sito di perossidasi
  - 2.6.2 - Sito di cicloossigenasi
- 2.7 - Glicosilazione 14
- 2.8 - Ossido nitrico 14

## **3 - Inibitori 15**

- 3.1 - Dipendenza dal tempo 15
- 3.2 - Inibizione selettiva 18
- 3.3 - Aspirina 19

## **4 - Docking molecolare 21**

- 4.1 - Scelta della struttura cristallografica e dei programmi 21
- 4.2 - Preparazione della proteina e dei ligandi 23
- 4.3 - Acido arachidonico 24
- 4.4 - Aspirina 26
- 4.5 - Ketoprofene 27
- 4.6 - Paracetamolo 29
- 4.7 - Diclofenac 31
- 4.8 - Indometacina 33
- 4.9 - Ketorolac 35
- 4.10 - Celecoxib 37
- 4.11 - Firocoxib 39
- 4.12 - Progettazione di nuovi farmaci: proposte  $\beta$  e  $\gamma$  42

## **5 - Risposte dell'organismo 47**

- 5.1 - Recettori 47
- 5.2 - Apparato circolatorio 48
- 5.3 - Infiammazione 49
- 5.4 - Febbre 49
- 5.5 - Cervello 50
- 5.6 - Dolore 50
- 5.7 - Tratto gastro-intestinale 50
- 5.8 - Riproduzione 51
- 5.9 - Cancro 51

Bibliografia 53

Ringraziamenti 55

# 1 - INTRODUZIONE

## 1.1 - Farmaci anti-infiammatori

Gli anti-infiammatori sono farmaci ampiamente utilizzati nella vita quotidiana grazie alla loro triplice azione anti-infiammatoria, analgesica e antipiretica.

Questi farmaci possono essere suddivisi in due categorie:

- 1- Farmaci anti-infiammatori steroidei
- 2- Farmaci anti-infiammatori non steroidei

I farmaci anti-infiammatori steroidei sono steroidi che inibiscono un enzima chiamato fosfolipasi A2, la quale trasforma i fosfolipidi della membrana cellulare in acido arachidonico innescando la risposta infiammatoria (fig.1). Questi farmaci sono immediatamente riconoscibili poiché, essendo steroidi, la loro struttura deriva dal ciclopentanoperidrofenantrene (fig.2).

I farmaci anti-infiammatori non steroidei, comunemente chiamati con l'acronimo FANS, hanno invece strutture molto diverse tra loro e agiscono inibendo enzimi chiamati cicloossigenasi, la cui azione porta alla trasformazione dell'acido arachidonico in prostaglandina (fig.1).

Questo ci fa intuire che i farmaci Anti-infiammatori steroidei hanno un'azione molto più radicale dei FANS, in quanto bloccano la risposta infiammatoria all'origine. Tuttavia l'impiego dei FANS è preferito rispetto all'uso di farmaci cortisonici, i quali possiedono effetti collaterali molto più vistosi e pericolosi.

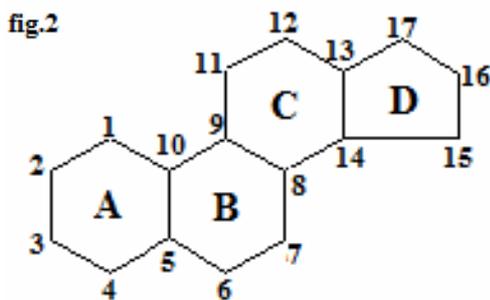
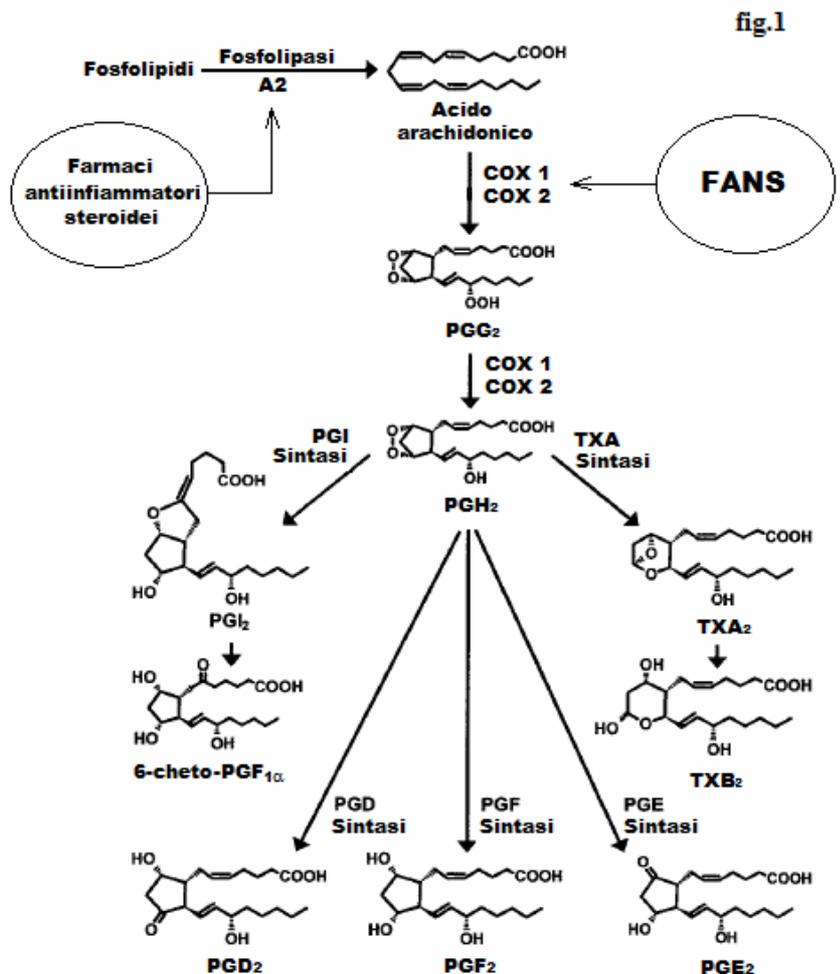


Fig.1: rappresentazione schematica della cascata di segnali Chimici prodotta durante l'infiammazione.

Fig.2: struttura del ciclopentanoperidrofenantrene con numerazione



## 1.2 - Cicloossigenasi e prostaglandine

Le cicloossigenasi sono una classe di isoenzimi il cui scopo è quello di convertire l'acido arachidonico in prostaglandina, attraverso reazioni di cicloossigenazione radicalica. Le prostaglandine prodotte da questa reazione e modificate dalle varie sintasi (fig.1) possono avere svariati impieghi non solo nel mediare l'infiammazione (ad esempio PGE<sub>2</sub> è un potente vasodilatatore che induce un maggior apporto di sangue alle zone del corpo che hanno subito un trauma), ma anche nel controllo della coagulazione, nella produzione degli acidi gastrici e in molte altre regioni del corpo umano. Le prime ricerche sulle prostaglandine risalgono al XX secolo quando, negli anni '30, vennero estratte per la prima volta dal liquido seminale. Solo durante gli anni '50 e '60 gli scienziati riuscirono a purificarle e identificarne il precursore. In seguito, negli anni '70, venne purificata anche la cicloossigenasi e iniziarono consistenti ricerche sulla loro inibizione.

L'obiettivo di questa tesina è mostrare come sono fatte le cicloossigenasi, come interagiscono con i FANS e quali effetti sull'organismo può provocare la loro inibizione. Un ulteriore obiettivo di tipo sperimentale è quello di progettare un nuovo farmaco anti-infiammatorio usando tecniche di chimica computazionale per eseguire il Docking Molecolare cioè per valutare se il farmaco progettato è in grado di interagire con forza con il suo bersaglio.

## 2 - CICLOOSSIGENASI

L'enzima adibito alla conversione dell'acido arachidonico (C<sub>20:4</sub> Δ<sup>5,8,11,14</sup>) in prostaglandina è un enzima di membrana chiamato cicloossigenasi. Negli anni '70 si pensava che l'enzima richiedesse ATP per cicloossigenare l'acido arachidonico, per questo venne classificato sintetasi. Negli anni seguenti si scoprì che l'enzima non richiedeva affatto ATP, perciò fu classificato sintasi. Il suo nome attuale è prostaglandina endoperossido sintasi (E.C. 1.14.99.1). Tuttavia è conosciuto con molti altri nomi quali:

- Prostaglandina H sintasi (PGHS)
- Cicloossigenasi (COX)
- Prostaglandina sintetasi

Per cicloossigenare l'acido arachidonico, quest'enzima richiede la presenza di un cofattore che catalizzi la reazione: l'heme

### 2.1 - Isoforme

Esistono vari tipi di cicloossigenasi ma le isoforme fondamentali dell'enzima sono due: COX-1 e COX-2. Possiamo fare questa distinzione grazie agli studi genetici sulla proteina, infatti è stato scoperto che esistono due soli geni codificanti le PGHS (Fig.1). Inoltre, sulla base di come viene eseguito lo splicing del trascritto primario, possiamo ottenere (oltre alla COX-1 e alla COX-2) enzimi molto diversi tra loro, tra cui isoforme con introni ritenuti, come la COX-3, e isoforme con esoni scartati come le PCOX.

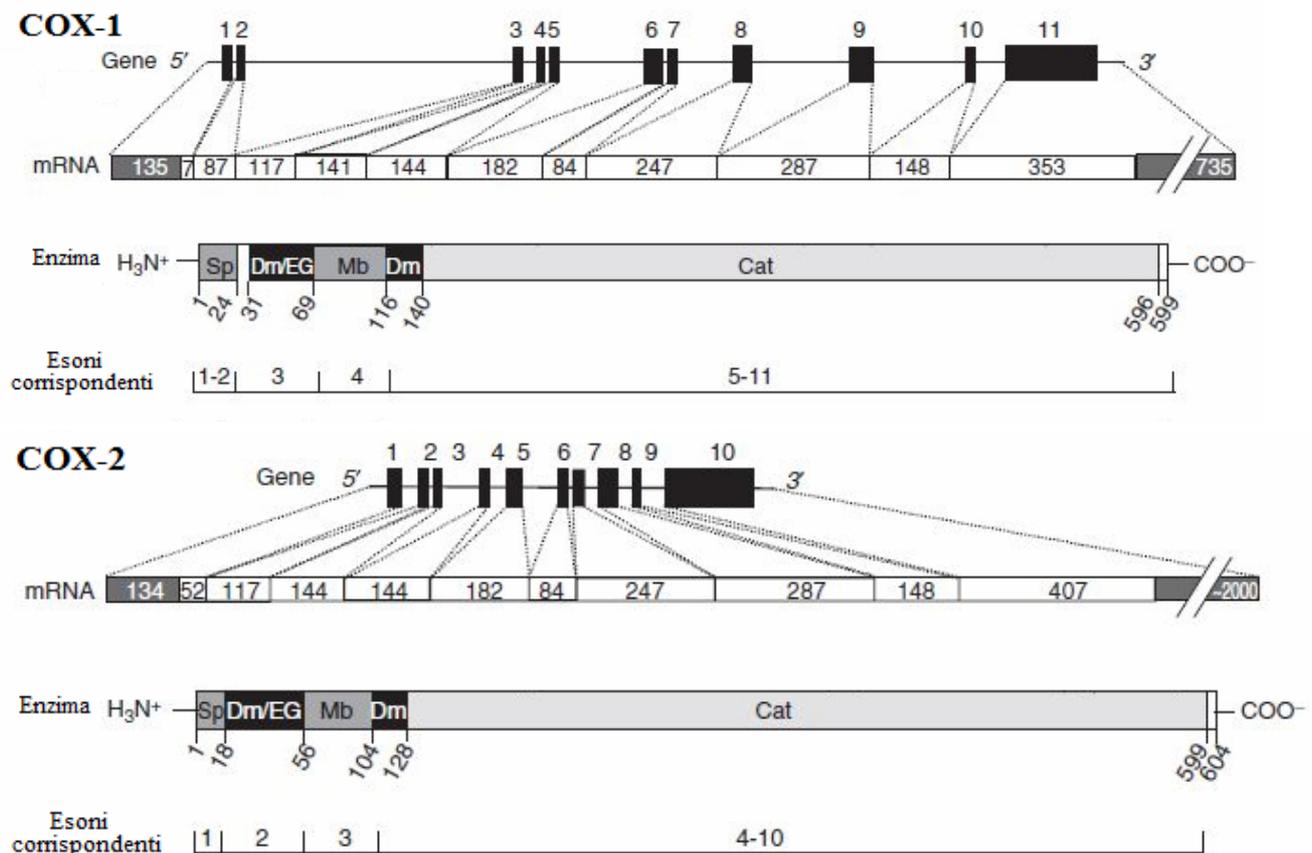


Fig.1: Rappresentazione schematica del gene codificante, della corrispettiva sequenza di mRNA, dell'enzima e degli esoni codificanti l'enzima. Nella parte riferita all'enzima si possono notare i domini di dimerizzazione (Dm), il dominio di legame al reticolo endoplasmatico (Mb), il peptide-segnalatore (Sp) e il dominio catalitico (Cat).

La sequenza primaria della COX-1 rivela il 60% di identità con quella della COX-2, mentre la struttura terziaria e quaternaria sono molto simili.

Tab.1: Tabella dove vengono riportate alcune informazioni genetiche e strutturali delle isoforme 1 e 2

| <b>PROPRIETA'</b>              | <b>COX-1</b>            | <b>COX-2</b>                                |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------|
| Posizione nel cromosoma        | 9q32-q33.3              | 1q25.2-25.3                                 |
| Dimensione del gene            | Circa 22 kb             | Circa 8 kb                                  |
| Numero di esoni                | 11                      | 10                                          |
| Numero di introni              | 10                      | 9                                           |
| Dimensione regione codificante | 1797 nucleotidi         | 1812 nucleotidi                             |
| Espressione                    | Costitutiva             | Inducibile                                  |
| Lunghezza proteina             | 599 amminoacidi         | 604 amminoacidi                             |
| Numero siti di glicosilazione  | 3                       | 3 o 4                                       |
| Struttura quaternaria          | Omodimero               | Omodimero                                   |
| Posizione subcellulare         | Reticolo endoplasmatico | Reticolo endoplasmatico e membrana nucleare |

La COX-3 è un' importante isoforma delle PGHS. Infatti viene espressa soprattutto nel cervello ed è il target di molti antiinfiammatori ad azione antipiretica. Il gene codificante la COX-3 è lo stesso della COX-1 solo che, durante il processo di splicing viene ritenuto l'introne 1 (Fig.1).

Le PCOX, invece, sono cicloossigenasi parziali formate mediante lo scarto di alcuni esoni. La loro funzione, come quella della COX-3, non è ancora del tutto chiara.

## 2.2 - Sequenza primaria dell'enzima

Di seguito è riportato l'allineamento delle sequenze primarie delle COX-1 e delle COX-2 umane (homo sapiens), di pecora (ovis aries) e di topo (mus musculus).

|             |      |            |             |            |             |             |
|-------------|------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|
|             |      | 10         | 20          | 30         | 40          | 50          |
| HomoSapiens | COX1 | -----      | -----       | -----      | MSR-SLLWF   | LLFLLLL---  |
| OvisAries   | COX1 | -----      | -----       | -----      | MSRQISLRF   | PLLLLL---   |
| MusMusculus | COX1 | -----      | -----       | -----      | MSRRSLSLWF  | PLLLLLL-P   |
| HomoSapiens | COX2 | -----      | -----       | -----      | -----       | -----ML     |
| OvisAries   | COX2 | -----      | -----       | -----      | -----       | -----ML     |
| MusMusculus | COX2 | -----      | -----       | -----      | -----       | -----ML     |
|             |      | 60         | 70          | 80         | 90          | 100         |
| HomoSapiens | COX1 | PPLPVLLADP | GAPTPVNPCC  | YYPQHQGGIC | VRFGLDRYQC  | DCTRIGYSGP  |
| OvisAries   | COX1 | SPSPVFSADP | GAPAPVNPCC  | YYPQHQGGIC | VRFGLDRYQC  | DCTRIGYSGP  |
| MusMusculus | COX1 | PTPSVLLADP | GVPSPVNPCC  | YYPQHQGGIC | VRFGLDNYQC  | DCTRIGYSGP  |
| HomoSapiens | COX2 | ARALLLCAVL | ALSHTANPCC  | SHPCQNRGVC | MSVGFQYKC   | DCTRIGFYGE  |
| OvisAries   | COX2 | ARALLLCAAV | -VCGAANPCC  | SHPCQNRGVC | MSVGFQYKC   | DCTRIGFYGE  |
| MusMusculus | COX2 | FRAVLLCAAL | GLSQAANPCC  | SNPCQNRGEC | MSTGFQYKC   | DCTRIGFYGE  |
|             |      | 110        | 120         | 130        | 140         | 150         |
| HomoSapiens | COX1 | NCTIPGLWTW | LRNSLRPSPS  | FTHFLLTHGR | WFWEFVNA-T  | FIREMLMLRV  |
| OvisAries   | COX1 | NCTIPEIWTW | LRTTLRPSPS  | FIHFMLTHGR | WLWDFVNA-T  | FIRDTLMLRV  |
| MusMusculus | COX1 | NCTIPEIWTW | LRNSLRPSPS  | FTHFLLTHGR | WLWDFVNA-T  | FIREVLMMLRV |
| HomoSapiens | COX2 | NCSTPEFLTR | IKLFLKPTPN  | TVHYILTHFK | GFWNVNNIP   | FLRNAIMSYV  |
| OvisAries   | COX2 | NCTIPEFLTR | IKLLLKPTPD  | TVHYILTHFK | GVWNIIVNKIS | FLRNIMRYV   |
| MusMusculus | COX2 | NCTIPEFLTR | IKLLLKPTPN  | TVHYILTHFK | GVWNIIVNNIP | FLRSLIMKYV  |
|             |      | 160        | 170         | 180        | 190         | 200         |
| HomoSapiens | COX1 | LTVRSNLIPS | PPTYNSAHDY  | ISWESFSNVS | YYTRILPSVP  | KDCPTPMGTK  |
| OvisAries   | COX1 | LTVRSNLIPS | PPTYNIAHDY  | ISWESFSNVS | YYTRILPSVP  | RDCPTPMGTK  |
| MusMusculus | COX1 | LTVRSNLIPS | PPTYNSAHDY  | ISWESFSNVS | YYTRILPSVP  | KDCPTPMGTK  |
| HomoSapiens | COX2 | LTSRSHLIDS | PPTYNADYGY  | KSWEAFSNLS | YYTRALPPVP  | DDCPTPLGVK  |
| OvisAries   | COX2 | LTSRSHLIES | PPTYNVHYSY  | KSWEAFSNLS | YYTRALPPVP  | DDCPTPMGVK  |
| MusMusculus | COX2 | LTSRSHLIDS | PPTYNVHYGY  | KSWEAFSNLS | YYTRALPPVA  | DDCPTPMGVK  |
|             |      | 210        | 220         | 230        | 240         | 250         |
| HomoSapiens | COX1 | GKKQLPDAQL | LARRFLLRRK  | FIPDPQGTNL | MFAFFAQHFT  | HQFFKTSGKM  |
| OvisAries   | COX1 | GKKQLPDAEF | LSRRFLLRRK  | FIPDPQGTNL | MFAFFAQHFT  | HQFFKTSGKM  |
| MusMusculus | COX1 | GKKQLPDVQL | LAQQLLRRE   | FIPAPQGTNI | LFAFFAQHFT  | HQFFKTSGKM  |
| HomoSapiens | COX2 | GKKQLPDSNE | IVEKLLRRK   | FIPDPQGSNM | MFAFFAQHFT  | HQFFKTDHKK  |
| OvisAries   | COX2 | GRKELPDSKE | VVKVLLRRK   | FIPDPQGTNL | MFAFFAQHFT  | HQFFKTDIER  |
| MusMusculus | COX2 | GNKELPDSKE | VLEKVLLRRE  | FIPDPQGSNM | MFAFFAQHFT  | HQFFKTDHKK  |
|             |      | 260        | 270         | 280        | 290         | 300         |
| HomoSapiens | COX1 | GPGFTKALGH | GVDLGHIYGD  | NLERQYQLRL | FKDGKLYQV   | LDGEMYPSPV  |
| OvisAries   | COX1 | GPGFTKALGH | GVDLGHIYGD  | NLERQYQLRL | FKDGKLYQM   | LNGEVYPPSV  |
| MusMusculus | COX1 | GPGFTKALGH | GVDLGHIYGD  | NLERQYHLRL | FKDGKLYQV   | LDGEMYPSPV  |
| HomoSapiens | COX2 | GPAFTNGLGH | GVDLNHIYGE  | TLARQRKLRL | FKDGKMKYQI  | IDGEMYPPTV  |
| OvisAries   | COX2 | GPAFTKGNH  | GVDSLHVVYGE | SLERQHNRRL | FKDGKMKYQM  | INGEMYPPTV  |
| MusMusculus | COX2 | GPGFTRGLGH | GVDLNHIYGE  | TLDRQHKLRL | FKDGKLYQV   | IGDEVYPTV   |
|             |      | 310        | 320         | 330        | 340         | 350         |
| HomoSapiens | COX1 | EEAP-VLMHY | PRGIPPQSQM  | AVGQEVFGLL | PGLMLYATIW  | LREHNRVCDL  |
| OvisAries   | COX1 | EEAP-VLMHY | PRGIPPQSQM  | AVGQEVFGLL | PGLMLYATIW  | LREHNRVCDL  |
| MusMusculus | COX1 | EQAS-VLMRY | PPGVPPERQM  | AVGQEVFGLL | PGLMLFSTIW  | LREHNRVCDL  |
| HomoSapiens | COX2 | KDTQ-AEMII | PPQVPEHLRF  | AVGQEVFGLV | PGLMMYATIW  | LREHNRVCDV  |
| OvisAries   | COX2 | KDTQ-VEMIY | PPHIPEHLKF  | AVGQEVFGLV | PGLMMYATIW  | LREHNRVCDV  |
| MusMusculus | COX2 | KDTQ-VEMIY | PPHIPENLQF  | AVGQEVFGLV | PGLMMYATIW  | LREHNRVCDI  |
|             |      | 360        | 370         | 380        | 390         | 400         |
| HomoSapiens | COX1 | LKAEHPTWGD | EQLFQTTRLI  | LIGETIKIVI | EEYVQQLSGY  | FLQLKFDPEL  |
| OvisAries   | COX1 | LKAEHPTWGD | EQLFQTARLI  | LIGETIKIVI | EEYVQQLSGY  | FLQLKFDPEL  |
| MusMusculus | COX1 | LKEEHPTWDD | EQLFQTTRLI  | LIGETIKIVI | EEYVQHLSGY  | FLQLKFDPEL  |
| HomoSapiens | COX2 | LKQEHPEWGD | EQLFQTSRLI  | LIGETIKIVI | EDYVQHLSGY  | HFKLKFDPEL  |
| OvisAries   | COX2 | LKQEHPEWGD | EQLFQTSRLI  | LIGETIKIVI | EDYVQHLSGY  | HFKLKFDPEL  |
| MusMusculus | COX2 | LKQEHPEWGD | EQLFQTSRLI  | LIGETIKIVI | EDYVQHLSGY  | HFKLKFDPEL  |

|             |      |            |             |            |             |             |      |
|-------------|------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
|             |      | 410        | 420         | 430        | 440         | 450         |      |
| HomoSapiens | COX1 | LFGVQFQYRN | RIAMEFNHLY  | HWHPLMPDSF | KVGSQEYSYE  | QFLFNTSMLV  |      |
| OvisAries   | COX1 | LFGAQFQYRN | RIAMEFNQLY  | HWHPLMPDSF | RVGFPQDYSYE | QFLFNTSMLV  |      |
| MusMusculus | COX1 | LFRAQFQYRN | RIAMEFNHLY  | HWHPLMPNSF | QVGSQEYSYE  | QFLFNTSMLV  |      |
| HomoSapiens | COX2 | LFNKQFQYQN | RIAAEFNTLY  | HWHPLLPDTF | QIHDQKYNQYQ | QFIYNNISILL |      |
| OvisAries   | COX2 | LFNQQFQYQN | RIAAEFNTLY  | HWHPLLPDVF | QIDGQEYNYQ  | QFIYNNISVLL |      |
| MusMusculus | COX2 | LFNQQFQYQN | RIASEFNTLY  | HWHPLLPDTF | NIEDQEYSFK  | QFLYNNISILL |      |
|             |      | 460        | 470         | 480        | 490         | 500         |      |
| HomoSapiens | COX1 | DYGVEALVDA | FSRQIAGRIG  | GGRNMDHHIL | HVAVDVIRE   | REMLRQPNE   |      |
| OvisAries   | COX1 | DYGVEALVDA | FSRQPAGRIG  | GGRNIDHHIL | HVAVDVIKES  | RVLRLQPNE   |      |
| MusMusculus | COX1 | DYGVEALVDA | FSRQRAGRIG  | GGRNFDYHVL | HVAVDVIKES  | REMLRQPNE   |      |
| HomoSapiens | COX2 | EHGITQFVES | FTRQIAGRVA  | GGRNVPPAVQ | KVSQASIDQS  | RQMKYQSFNE  |      |
| OvisAries   | COX2 | EHGVTQFVES | FTRQIAGRVA  | GRRNLPAAVE | KVSKASLDQS  | REMKYQSFNE  |      |
| MusMusculus | COX2 | EHGLTQFVES | FTRQIAGRVA  | GGRNVPIAVQ | AVAKASIDQS  | REMKYQSLNE  |      |
|             |      | 510        | 520         | 530        | 540         | 550         |      |
| HomoSapiens | COX1 | YRKRFGMKPY | TSFQELVGEK  | EMAAELEELY | GDIDALEFYP  | GLLLEKCHPN  |      |
| OvisAries   | COX1 | YRKRFGMKPY | TSFQELTGEK  | EMAAELEELY | GDIDALEFYP  | GLLLEKCHPN  |      |
| MusMusculus | COX1 | YRKRFGMKPY | TSFQELTGEK  | EMAAELEELY | GDIDALEFYP  | GLLLEKCHPN  |      |
| HomoSapiens | COX2 | YRKRFLKPY  | ESFEELTGEK  | EMSAELEALY | GDIDAVELYP  | ALLVEKPRPD  |      |
| OvisAries   | COX2 | YRKRFLKPY  | ESFEELTGEK  | EMAAELEALY | GDIDAMELYP  | ALLVEKPAD   |      |
| MusMusculus | COX2 | YRKRFLKPY  | TSFEELTGEK  | EMAAELKALY | SDIDVMELYP  | ALLVEKPRPD  |      |
|             |      | 560        | 570         | 580        | 590         | 600         |      |
| HomoSapiens | COX1 | SIFGESMIEI | GAPFSLKGLL  | GNPICSPEYW | KPSTFGGEVG  | FNIVKTATLK  |      |
| OvisAries   | COX1 | SIFGESMIEM | GAPFSLKGLL  | GNPICSPEYW | KASTFGGEVG  | FNLVKTATLK  |      |
| MusMusculus | COX1 | SIFGESMIEM | GAPFSLKGLL  | GNPICSPEYW | KPSTFGGDVG  | FNLVNTASLK  |      |
| HomoSapiens | COX2 | AIFGETMVEV | GAPFSLKGLM  | GNVICSPAYW | KPSTFGGEVG  | FQIINTASIQ  |      |
| OvisAries   | COX2 | AIFGETMVEA | GAPFSLKGLM  | GNPICSPEYW | KPSTFGGEVG  | FKIINTASIQ  |      |
| MusMusculus | COX2 | AIFGETMVEL | GAPFSLKGLM  | GNPICSPEYW | KPSTFGGEVG  | FKIINTASIQ  |      |
|             |      | 610        | 620         | 630        | 640         | 650         | 654  |
| HomoSapiens | COX1 | KLVLNNTKT- | CPYVSFRVP-  | DASQDDGPAV | ERPSTEL---  | -----       | ---- |
| OvisAries   | COX1 | KLVLNNTKT- | CPYVSFHVLP- | DPRQEDRGPV | ERPSTEL---  | -----       | ---- |
| MusMusculus | COX1 | KLVLNNTKT- | CPYVSFRVP-  | DYPGDDGSVL | VRSTEL---   | -----       | ---- |
| HomoSapiens | COX2 | SLICNNVKG- | CPFTSFSVPD  | PELIKTVTIN | ASSRSGLDD   | INPTVLLKER  | STEL |
| OvisAries   | COX2 | SLICSNVKG- | CPFTSFSVQD  | AHLTKVTIN  | ASSSHSGLDD  | INPTVLLKER  | STEL |
| MusMusculus | COX2 | SLICNNVKG- | CPFTSFNVDQ  | PQPTKTATIN | ASASHSRLLDD | INPTVLIKRR  | STEL |

Si può notare che le sequenze di una stessa isoforma sono molto simili tra loro, e che COX-1 e COX-2 sono molto differenti in corrispondenza degli estremi della sequenza.

## 2.3 - Peptide-segnalatore

La struttura delle PGHS suggerisce che queste siano proteine di membrana collocate nei lumi del reticolo endoplasmatico (RE) e nella membrana nucleare. Le neosintetizzate cicloossigenasi possiedono infatti un peptide-segnalatore (Sp), la cui funzione è quella di dirigerle nei lumi del reticolo endoplasmatico. Questo peptide N-terminale a carattere idrofobico comprende tra 22 e 26 amminoacidi (31→57) nella COX-1 e 17 amminoacidi (48→65) nella COX-2. Ci sono circa 8 residui presenti nell'isoforma -1 che non compaiono nella -2 e la loro funzione non è ancora del tutto chiara. Tuttavia, la COX-1 è molto rapida nel trasferirsi nei lumi del RE mentre la COX-2 lo fa in modo molto meno efficiente, forse a causa di questi residui mancanti.

## 2.4 - Dominio di dimerizzazione

Le PGHS si presentano generalmente come omodimeri i cui monomeri sono legati tra loro mediante legami a idrogeno (circa 30), interazioni idrofobiche (circa 5) e ponti salini (< 5).

Sono presenti inoltre quattro ponti disolfuro che non partecipano ai legami di dimerizzazione. Tre di questi costringono il dominio di dimerizzazione (Dm) a mantenere la sua forma; il quarto, invece, è necessario poiché lega il dominio di dimerizzazione al dominio catalitico. La presenza di questi ponti disolfuro suggerisce, come nel caso del dominio SP, che la proteina sia dislocata in un ambiente più ossidante del citosol, come appunto il RE, la membrana nucleare o il Golgi.

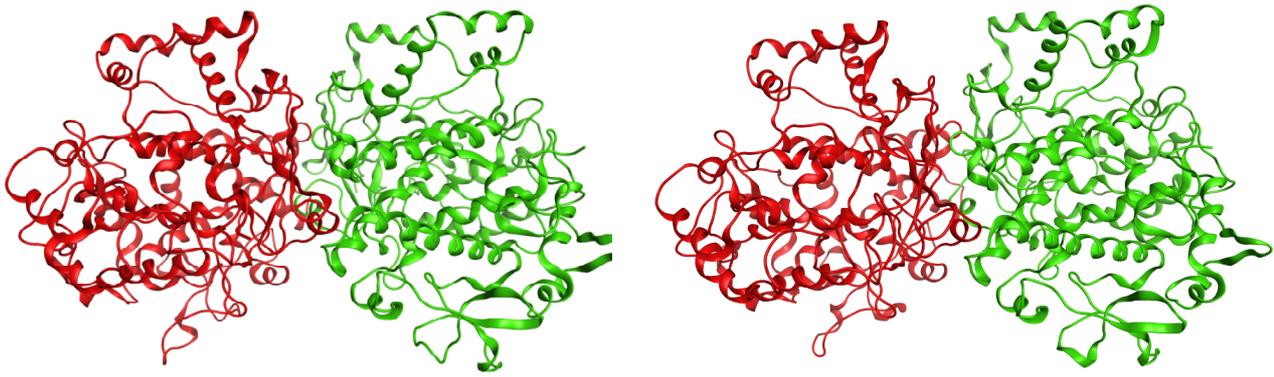


Fig.2: Omodimero della cicloossigenasi-1 (a sinistra) e -2 (a destra). Le rappresentazioni sono tratte rispettivamente dai file PDB 1CQE e 3HS5.

## 2.5 - Dominio di legame alla membrana

Le cicloossigenasi si legano alla membrana nucleare o al reticolo endoplasmatico in un modo caratteristico ed inusuale. Tutto dipende da un dominio chiamato Mb (membrane binding domain). Questo dominio è costituito da quattro  $\alpha$  eliche (cerchiate e colorate in rosso in Fig.3) a carattere idrofobico che entrano nei lumi della membrana e del RE, instaurando con esso interazioni di Van der Waals. Il dominio Mb penetra nel lume della membrana fino a circa  $16\text{\AA}$  di profondità, mentre la membrana è spessa circa  $40\text{\AA}$ .

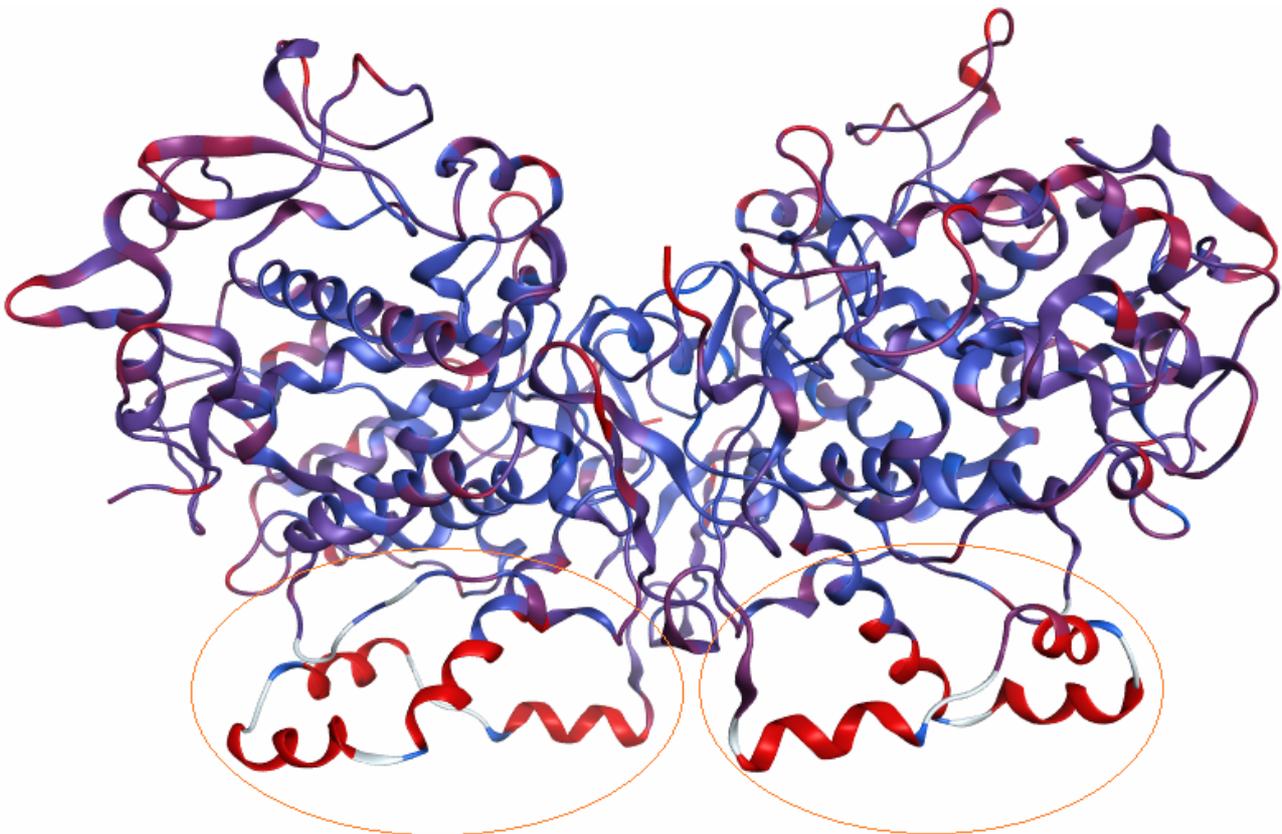


Fig.3: Rappresentazione grafica della COX-1 tratta dal file PDB 1CQE. Cerchiate in arancio si possono notare le 4  $\alpha$  eliche che, in ognuno dei due monomeri, costituiscono il dominio di legame alla membrana.

## 2.6 - Dominio catalitico

Mentre i domini Sp, Dm e Mb costituiscono la parte N-terminale delle PGHS, il dominio catalitico ne costituisce la parte C-terminale e comprende circa l'80% dell'enzima.

Questo dominio contiene a sua volta due siti attivi globulari distinti che richiedono substrati diversi:

- Sito di perossidasi
- Sito di cicloossigenasi

I due siti eseguono due cicli di reazioni tra loro collegati, riportati in figura 4:

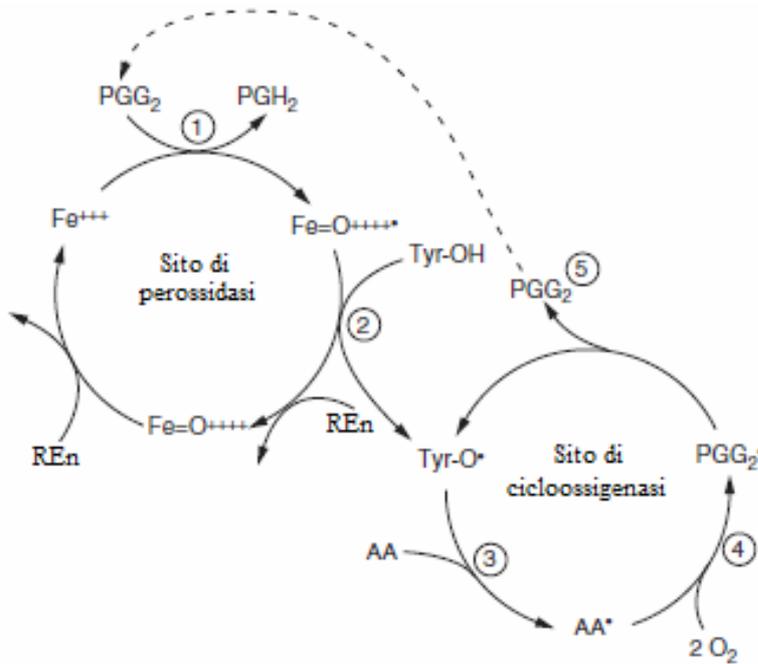


Fig.4: PGG<sub>2</sub>-PGH<sub>2</sub> = prostaglandine; Tyr-OH = tirosina; Tyr-O• = tirosil-radiale; AA = acido arachidonico; REn = riducente endogeno.

Il primo step del ciclo di reazioni consiste nell'ossidazione dell'heme e nell'estrazione radicalica dell'idrogeno appartenente al gruppo -OH di Tyr385. Si forma così un tirosil-radiale (Fig.5). Questo radicale, a sua volta, estrae l'idrogeno in posizione 13 dell'acido arachidonico per formare prima PGG<sub>2</sub> e poi PGH<sub>2</sub> (Fig.6).

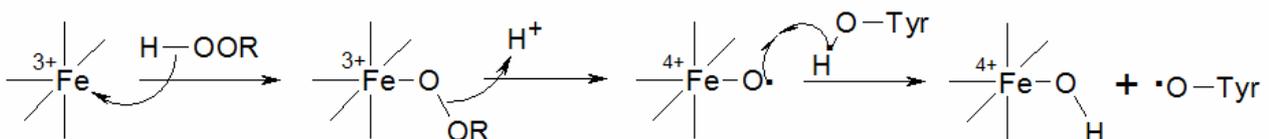


Fig.5

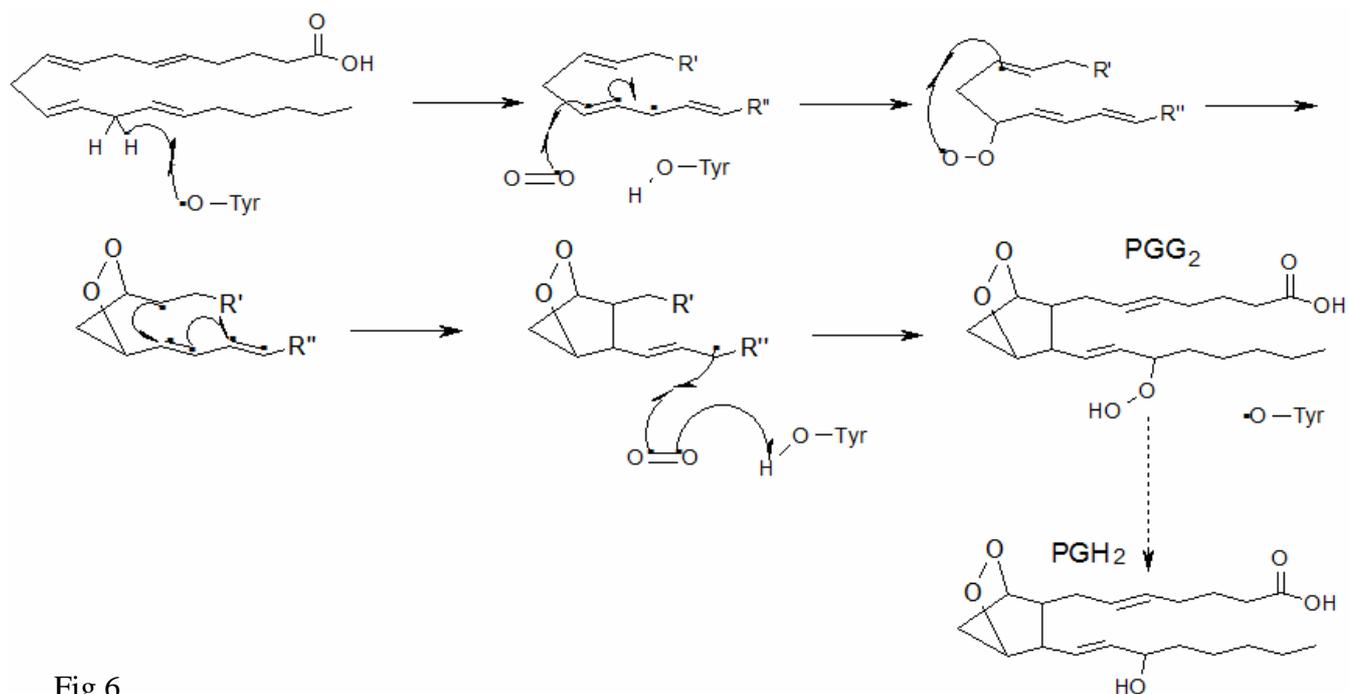


Fig.6

### 2.6.1 - Sito di perossidasi

Il sito di perossidasi è una tasca dell'enzima che sporge verso l'esterno. Fondamentali sono gli amminoacidi His388 (che coordina l'heme) e Tyr385, il quale fa da tramite tra i due siti catalitici (Fig.7 e Fig.8).

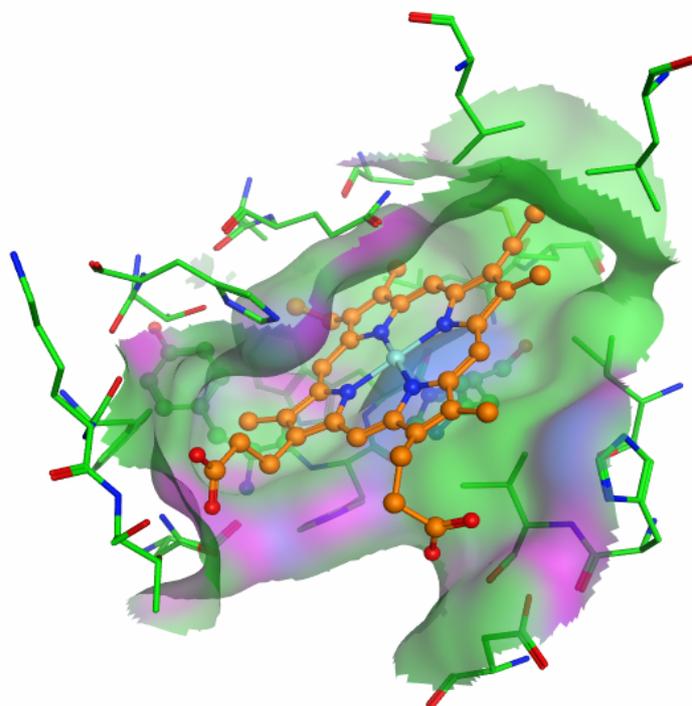


Fig.7: Rappresentazione grafica dell'heme all'interno della COX-1 (file PDB 1CQE). L'immagine è stata tratta dall'esterno dell'enzima per evidenziare la posizione sporgente del sito.

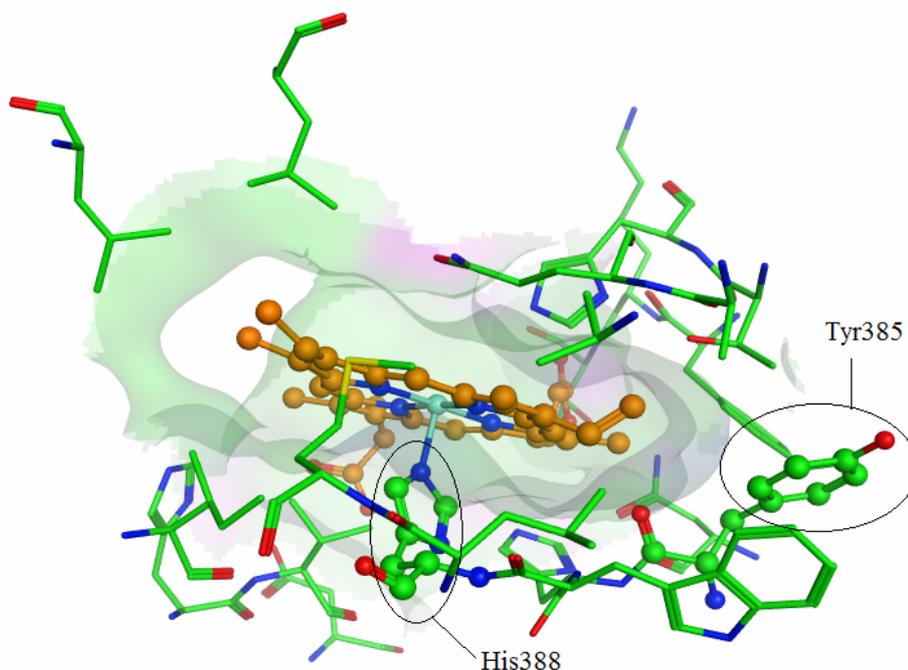


Fig.8: Rappresentazione grafica dell'heme all'interno della COX-1 (file PDB 1CQE). L'immagine è stata tratta dall'interno dell'enzima per evidenziare gli amminoacidi His388 e Tyr385.

## 2.6.2 - Sito di cicloossigenasi

Il sito di cicloossigenasi, attraverso la formazione del tirosil-radical, catalizza la reazione in figura 6. Questo sito è una stretta tasca a carattere idrofobico che si protrae interno all'enzima, larga circa 8Å e lunga circa 25Å. L'imbocco di questo canale è interno alle quattro  $\alpha$  eliche costituenti il dominio di legame alla membrana e possiede un punto di costrizione formato da una rete di legami a idrogeno tra Tyr355, Arg120 e Glu524. Uno dei punti fondamentali dell'interazione enzima-substrato è proprio questo poiché i gruppi carbossilici del substrato instaurano legami a idrogeno con Tyr355 e con Arg120 (Fig.9). L'interazione con Arg120 appare tuttavia non-essenziale nella COX-2 come lo è invece nella COX-1.

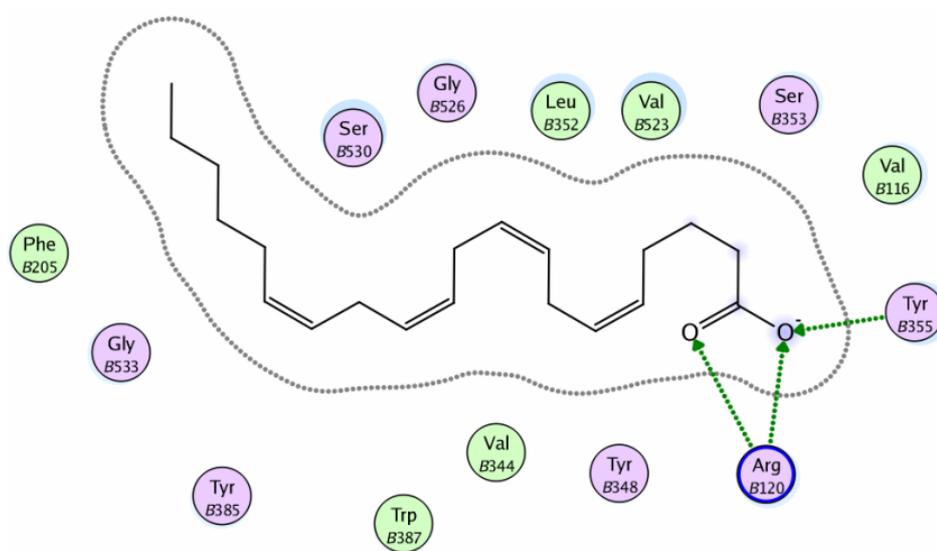


Fig.9: Immagine bidimensionale dell'acido arachidonico legato al sito di cicloossigenasi della COX-2 (PDB 3HS5).

Una sostanziale differenza tra le due isoforme si trova proprio nel dominio catalitico ed è data dall'amminoacido in posizione 523, che nel caso della COX-1 è un'isoleucina mentre per la COX-2 è una valina. Questo comporta una maggior voluminosità della tasca interna alla COX-2, caratteristica responsabile della selettività di alcuni farmaci verso la COX-2 (Fig.10).

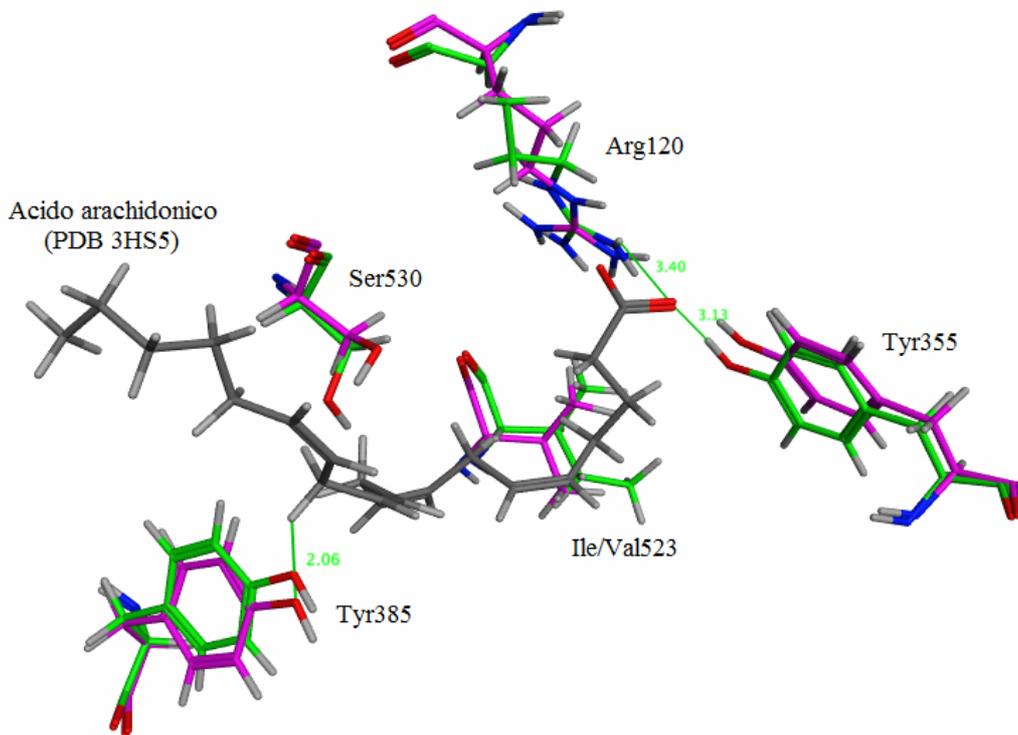


Fig.10: Sovrapposizione degli amminoacidi fondamentali del sito di cicloossigenasi della COX-1 (in verde) e della COX-2 (in fucsia). Come per tutti gli altri residui che compongono la tasca, si può notare che i residui fondamentali della COX-1 sono più vicini al substrato dei residui della COX-2. Sono inoltre riportate alcune distanze in Å, indicative delle dimensioni generali della tasca.

Oltre all'acido arachidonico, le PGHS possono interagire con altri substrati, producendo altri tipi di prostanoidei la cui funzione non è del tutto chiara. Ad esempio la COX-1 può cicloossigenare l'acido linoleico (C18:2  $\Delta^{9,12}$ ), mentre la COX-2 può cicloossigenare alcuni endocannabinoidi tra cui l'anandamide e il 2-arachidonil glicerolo (Fig.11).



Fig.11

Il dominio termina con una variante della sequenza KDEL, utilizzata come segnale di ritenzione nella membrana nucleare e nel RE.

## 2.7 - Glicosilazione

Le cicloossigenasi possono presentare in più punti della loro catena dei siti di glicosilazione, nei quali le asparagine dell'enzima legano generalmente derivati del mannosio. Inizialmente si pensava che la glicosilazione delle COXs fosse un fenomeno post- traduzione dell'RNA messaggero ma, attraverso alcuni esperimenti con endoglicosidasi, si dimostrò che il fenomeno avviene durante la traduzione, poiché la glicosilazione co-traduzionale promuove il corretto piegamento della sequenza amminoacidica. Di particolare importanza è la glicosilazione di Asn410 nella COX-1 e nelle PCOX-1, essenziale per l'attività dell'enzima. La COX-1 viene glicosilata quasi sempre in tre punti, mentre la COX-2 possiede generalmente un numero di siti di glicosilazione minore o uguale a quattro. Sebbene sia ancora in fase di studio e la sua funzione non sia ancora chiara, è stato statisticamente dimostrato che variazioni nella glicosilazione delle cicloossigenasi sono spesso indice di trasformazione delle cellule sane in cellule tumorali.

## 2.8 - Ossido nitrico

Per essere avviata, la reazione di cicloossigenasi richiede un agente che ossidi l'heme, possibilmente un perossido. Il maggior contributo nella produzione di composti ossidanti, capaci di attivare le reazioni di cicloossigenasi è dato dai perossinitriti, prodotti a partire dall'ossido nitrico. Per questo motivo, in base alla quantità di NO presente nell'organismo, si riesce a modulare l'attività delle cicloossigenasi. L'ossido nitrico è prodotto dalla NO sintasi. Esistono vari tipi di NO sintasi tra cui eNOS, nNOS e iNOS, che sono rispettivamente le NO sintasi epiteliali, neuronali e inducibili. La reazione che avviene in questi enzimi è riportata in figura 12.

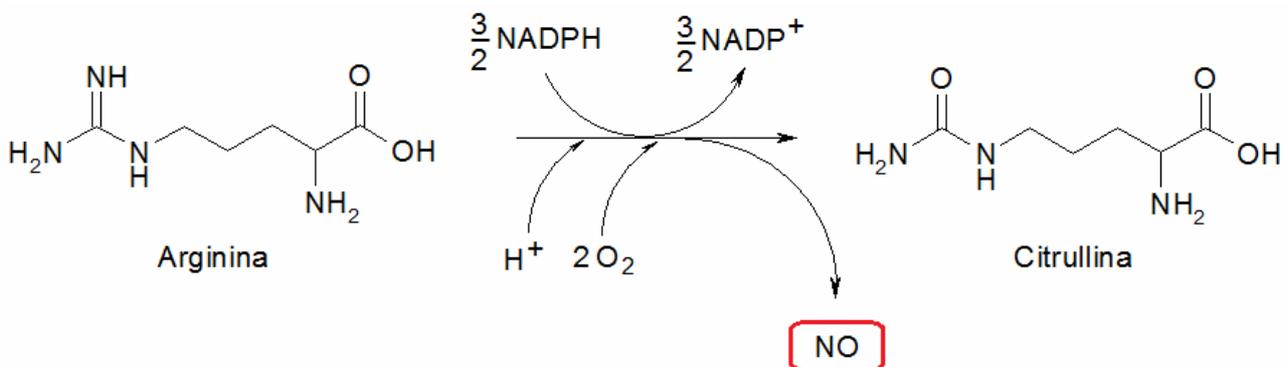


Fig.12: Reazione che avviene all'interno delle NO sintasi, mediante la quale viene prodotto NO.

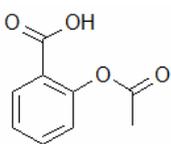
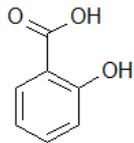
# 3 - INIBITORI

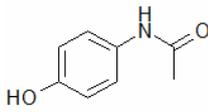
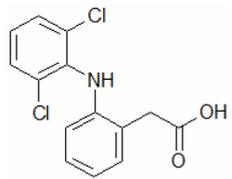
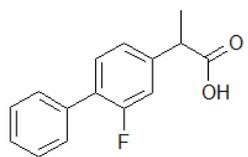
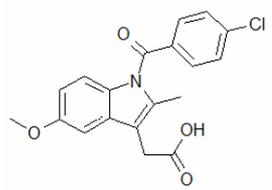
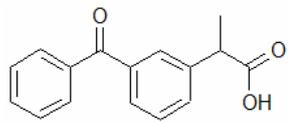
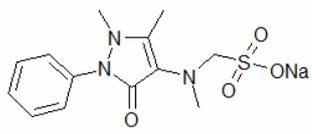
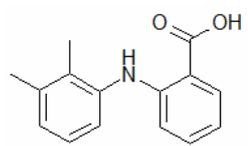
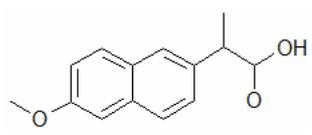
Le cicloossigenasi sono il target di moltissimi inibitori appartenenti alla famiglia dei farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS). Nella maggior parte dei casi questi farmaci sono inibitori competitivi i quali, gareggiando con il substrato nell'interagire col sito cicloossigenasico dell'enzima provocano un rallentamento nella produzione di prostaglandine, che si può manifestare attraverso la diminuzione dell'infiammazione, la difficoltà di coagulazione ematica, la vasodilatazione e molti altri sintomi. Il loro meccanismo d'azione venne definito nel '71, quando John Vane scoprì che questi farmaci inibivano le cicloossigenasi.

## 3.1 - Dipendenza dal tempo

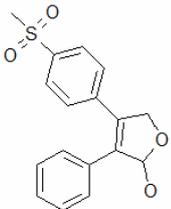
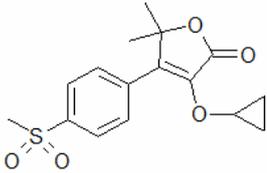
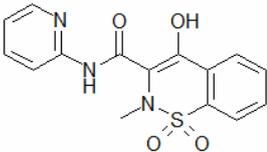
Il tempo è un fattore molto importante per il processo di inibizione enzimatica. Non tutti i FANS sono veloci ad entrare e ad uscire dalle cicloossigenasi, poiché devono attraversare il punto di costrizione formato dalla rete di legami a idrogeno tra Arg120, Tyr355 e Glu524. Ciò comporta una maggior durata dell'inibizione nel caso in cui il farmaco sia più lento ad attraversare questo punto. Sebbene alcuni farmaci, come l'ibuprofene, siano molto veloci ad entrare nel sito di cicloossigenasi dell'enzima, farmaci come l'indometacina e il diclofenac impiegano qualche secondo o, a volte, qualche minuto per compiere la stessa operazione. Inoltre, questi farmaci possiedono normalmente un tempo di uscita dall'enzima maggiore di quello di entrata; ciò implica il trascorrere di alcune ore prima che il farmaco riesca ad uscire liberando il sito attivo dell'enzima. Nella maggior parte dei casi l'aumento del tempo di uscita dal sito attivo deriva dalla formazione di ponti salini tra il gruppo guanidinico di Arg120 con i gruppi carbossilici degli inibitori. Per questo la presenza di gruppi carbossilici è una delle principali caratteristiche dei FANS.

Tab.1: in questa tabella sono riportate le strutture dei principali inibitori delle cicloossigenasi. Possiamo notare inoltre se il farmaco è un COX-2 selettivo e la sua classe di appartenenza.

| INIBITORE                         | STRUTTURA                                                                           | COX-2 SELETTIVO | CLASSE     | BREVE DESCRIZIONE                                                   |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------|---------------------------------------------------------------------|
| Acido acetilsalicilico (aspirina) |  | no              | Salicilati | Inibitore irreversibile: acetila le COX                             |
| Acido salicilico                  |  | no              | Salicilati | Precursore dell'acido acetilsalicilico e debole inibitore delle COX |

|                                  |                                                                                     |    |                              |                                                                                      |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Paracetamolo<br>(tachipirina)    |    | no | -                            | Debole inibitore delle COX con spiccata azione antipiretica                          |
| Diclofenac<br>(voltaren)         |    | no | Arilacetici                  | Impiegato per le sue proprietà analgesiche nella cura di dolori reumatici            |
| Flurbiprofene<br>(benactiv gola) |    | no | Arilpropionici               | Impiegato soprattutto nella cura dell' artrite                                       |
| Indometacina                     |   | no | Arilacetici                  | Impiegato soprattutto per le sue proprietà analgesiche e per evitare parti prematuri |
| Ketoprofene<br>(oki)             |  | no | Arilpropionici               | Molto versatile per la cura di infiammazioni e dolori                                |
| Metamizolo<br>(novalgina)        |  | no | -                            | Utilizzato per la cura di dolori vari e contro la febbre                             |
| Acido mefenamico                 |  | no | Derivati dell'acido fenamico | Impiegato nella cura di dolori medio-lievi e per traumi a tessuti molli              |
| Naprossene<br>(momendol)         |  | no | Arilpropionici               | Molto versatile per la cura di infiammazioni e dolori                                |

|                     |  |    |                |                                                                                                   |
|---------------------|--|----|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Oxaprozin           |  | no | Arilpropionici | Impiegato per il suo lungo tempo di semivita (>50h)                                               |
| Ibuprofene          |  | no | Arilpropionici | Molto versatile per la cura di infiammazioni e dolori                                             |
| Nimesulide (aulin)  |  | si | Solfonamidici  | Utilizzato per il trattamento del dolore acuto                                                    |
| Licofelone          |  | no | Arilacetici    | Azione simile al naprossene, inibisce anche le lipoossigenasi                                     |
| Ketorolac (toradol) |  | no | Arilacetici    | Ampiamente impiegato come analgesico postoperatorio per il suo effetto simil-oppiaceo             |
| Meloxicam           |  | si | Oxicam         | Impiegato nella cura di dolori articolari e reumatici moderati                                    |
| Etodolac            |  | si | Arilacetici    | Impiegato nel trattamento del dolore articolare lieve-moderato                                    |
| Celecoxib           |  | si | Coxib          | Impiegato nella cura di dolori articolari e reumatici moderati, può dare problemi cardiovascolari |

|           |                                                                                   |    |        |                                                                                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rofecoxib |  | si | Coxib  | Impiegato nella cura di dolori articolari e reumatici moderati, può spesso provocare problemi cardiovascolari |
| Firocoxib |  | si | Coxib  | Impiegato nella cura di dolori articolari e reumatici moderati, utilizzato nei cani e nei cavalli             |
| Piroxicam |  | si | Oxicam | Impiegato nella cura di dolori articolari e reumatici moderati                                                |

Le classi principali in cui possiamo suddividere i FANS sono fondamentalmente sette : Salicilati, Arilacetici, Arilpropionici, Derivati dell'acido fenamico, Solfonammidici, Oxicam e Coxib. Tuttavia la classificazione del paracetamolo e del metamizolo è ancora da determinare, infatti questi due farmaci possiedono gruppi funzionali completamente diversi da quelli presenti negli altri FANS, pertanto la loro classe è tutt'ora oggetto di accessi dibattiti.

### 3.2 - Inibizione selettiva

La minor voluminosità del sito di cicloossigenasi della COX-1 rispetto a quello della COX-2, che dipende dalla presenza in posizione 523 nella COX-1 di un'isoleucina, sostituita da una valina nella COX-2, permette l'impiego di farmaci COX-2 selettivi (Fig.1). Tali farmaci agiscono come potenti inibitori tempo-dipendenti della COX-2 e come deboli inibitori tempo-indipendenti della COX-1. Questi inibitori hanno infatti la caratteristica di essere più voluminosi dei classici FANS e di non contenere generalmente gruppi carbossilici, i quali sono sostituiti da gruppi metilsolfonici o da solfonammidi. Ciò comporta una minor intensità dell'interazione con Arg120, compensata dall'instaurazione di un maggior numero di legami a idrogeno e interazioni idrofobiche con gli altri residui del sito attivo. Sebbene questi farmaci siano i più appropriati per curare dolori infiammatori indotti da eventuali traumi, il loro impiego non è sempre sicuro e può provocare seri problemi all'apparato cardiovascolare, per questo motivo è preferibile l'impiego di farmaci che possiedono una moderata preferenza rispetto la COX-2. Sono inibitori COX-2 selettivi quelli appartenenti alla classe oxicam e coxib.

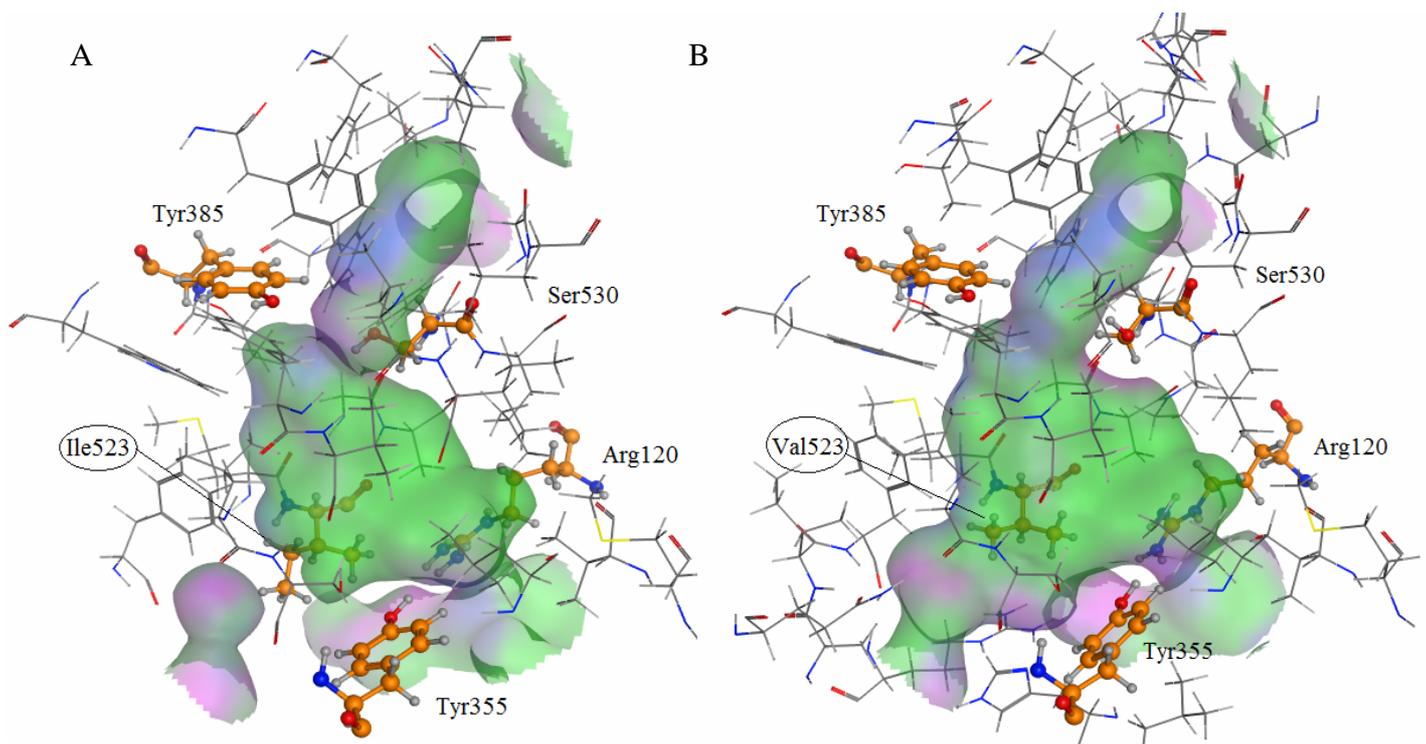


Fig. 1: A) Rappresentazione grafica del sito cicloossigenasico della COX-1 (PDB 1CQE).  
 B) Rappresentazione grafica del sito cicloossigenasico della COX-2 (PDB 3HS5).

In Fig.1 è evidente la differenza tra il sito attivo della COX-1 e della COX-2, che permette l'impiego di farmaci COX-2 selettivi.

### 3.3 - Aspirina

L'aspirina è stata uno dei primi farmaci utilizzati per curare il mal di testa. Il suo principio attivo, l'acido acetilsalicilico è uno dei pochi COX-inibitori che non agisce in modo competitivo, bensì in modo irreversibile. Infatti il trattamento con l'aspirina provoca l'acetilazione delle cicloossigenasi a livello dell'amminoacido Ser530 secondo la reazione riportata in Fig.2.

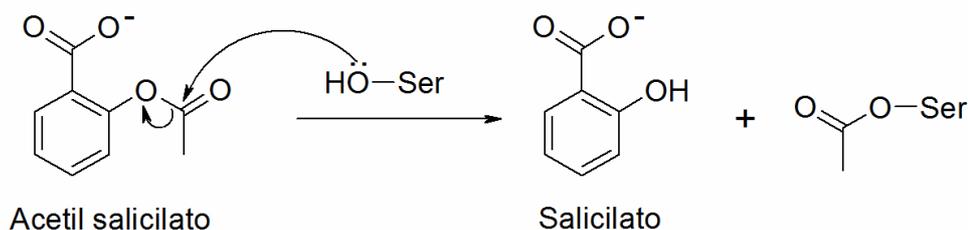


Fig.2

Subito l'acetilazione l'enzima non è più in grado di estrarre l'idrogeno in posizione 13 dell'acido arachidonico; di conseguenza l'attività dell'enzima risulta essere nulla.

Lo ione salicilato, oltre ad essere il precursore dell'aspirina è anche un debole inibitore competitivo delle cicloossigenasi. Fin dall'antichità sono stati infatti impiegati estratti della pianta del salice, contenenti acido salicilico, per curare il mal di testa e i dolori artrici.



# 4 - DOCKING MOLECOLARE

Al fine di verificare e quantificare le interazioni enzima-substrato ed enzima-inibitore, mi sono avvalso di alcuni software di modellistica molecolare per avviare alcune simulazioni di docking molecolare: un'operazione che consiste nella ricerca delle conformazioni che una molecola può assumere all'interno del sito attivo di una proteina. Questo è uno dei primi passi che i ricercatori adottano nell'elaborazione di nuovi farmaci.

Per eseguire il docking del substrato naturale e di vari inibitori su COX-1 e COX-2, ho dovuto prima trovare le strutture cristallografiche dell'enzima nel Protein Data Bank (PDB) e successivamente cercare i programmi adatti a lavorare sulle cicloossigenasi.

## 4.1 - Scelta della struttura cristallografica e dei programmi

Per scegliere la miglior struttura cristallografica da inserire nel software di modellistica molecolare, data la mancanza di cicloossigenasi di homo sapiens all'interno del Protein Data Bank, ho dovuto cercare le strutture primarie delle due isoforme umane e confrontarle con quelle delle altre specie presenti nel PDB. In questo modo ho trovato le percentuali di identità tra le strutture cristallografiche e le sequenze primarie, che mi hanno permesso di scegliere la struttura cristallografica più simile a quella umana.

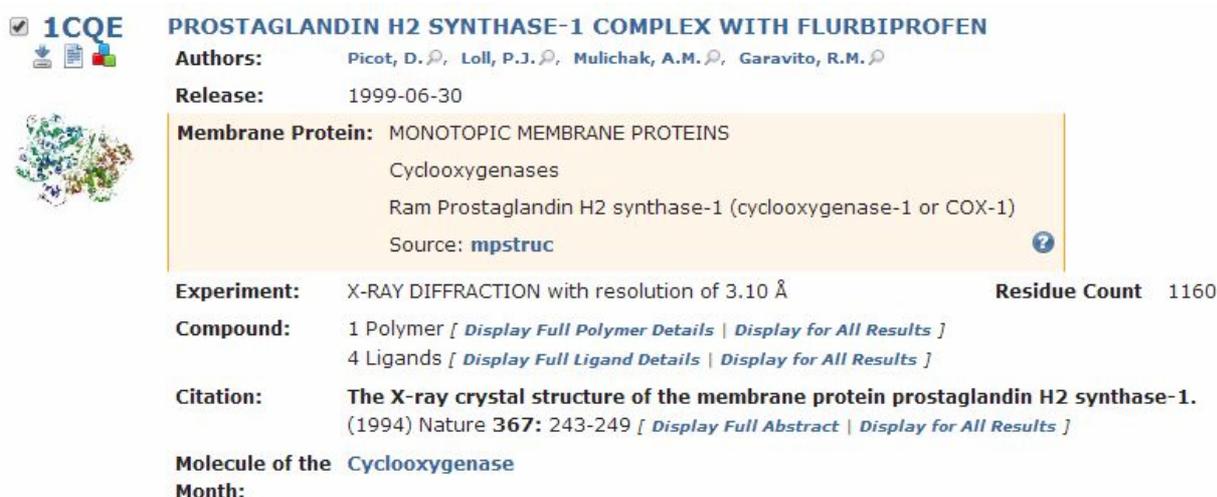
Per fare ciò ho scaricato le sequenze FASTA (file contenenti la struttura primaria della proteina) delle cicloossigenasi umane sul sito UNIPROT, e le ho inserite nel motore di ricerca BLAST del sito NCBI, impostando i vari filtri per ottenere le strutture cristallografiche del PDB aventi sequenza primaria più somigliante a quella della sequenza FASTA.

I risultati ottenuti dalla ricerca mi hanno portato a scegliere i file :

-1CQE per la COX-1 (fig.1)

-3HS5 per la COX-2 (fig.2)

Il file 1CQE è una cicloossigenasi di ovis aries (pecora) cristallizzata con flurbiprofene e mostra il 93% di somiglianza con la COX-1 umana, mentre il file 3HS5 è una cicloossigenasi di mus musculus (topo), cristallizzata con acido arachidonico e caratterizzata dall'87% di somiglianza con la COX-2 umana. Sarebbe stato meglio trovare isoforme 1 e 2 della stessa specie, ma purtroppo le percentuali di somiglianza sono troppo basse sia per la COX-2 di pecora che per la COX-1 di topo



**1CQE**  
PROSTAGLANDIN H2 SYNTHASE-1 COMPLEX WITH FLURBIPROFEN

**Authors:** Picot, D. , Loll, P.J. , Mulichak, A.M. , Garavito, R.M. 

**Release:** 1999-06-30

**Membrane Protein:** MONOTOPIC MEMBRANE PROTEINS  
Cyclooxygenases  
Ram Prostaglandin H2 synthase-1 (cyclooxygenase-1 or COX-1)  
Source: **mpstruc** 

**Experiment:** X-RAY DIFFRACTION with resolution of 3.10 Å **Residue Count** 1160

**Compound:** 1 Polymer [ [Display Full Polymer Details](#) | [Display for All Results](#) ]  
4 Ligands [ [Display Full Ligand Details](#) | [Display for All Results](#) ]

**Citation:** **The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1.**  
(1994) Nature **367**: 243-249 [ [Display Full Abstract](#) | [Display for All Results](#) ]

**Molecule of the Month:** **Cyclooxygenase**

Fig.1


**X-ray crystal structure of arachidonic acid bound to the cyclooxygenase channel of cyclooxygenase-2**

**Authors:** Vecchio, A.J. , Simmons, D.M. , Malkowski, M.G. 

**Release:** 2010-05-12

**Membrane Protein:** MONOTOPIC MEMBRANE PROTEINS  
 Cyclooxygenases  
 Cyclooxygenase-2  
 Source: **inferred by homology** 

**Experiment:** X-RAY DIFFRACTION with resolution of 2.10 Å **Residue Count** 1182

**Compound:** 1 Polymer [ [Display Full Polymer Details](#) | [Display for All Results](#) ]  
 7 Ligands [ [Display Full Ligand Details](#) | [Display for All Results](#) ]

**Citation:** **Structural basis of fatty acid substrate binding to cyclooxygenase-2.**  
 (2010) J.Biol.Chem. **285**: 22152-22163 [ [Display Full Abstract](#) | [Display for All Results](#) ]

**Molecule of the Month:** Cyclooxygenase

Fig.2

Fig.1 e 2 : Rappresentazione dei risultati della ricerca dei file 1CQE e 3H55 nel protein data bank. Da notare il numero di residui e la risoluzione della diffrazione ai raggi X.

Nei file PDB si è osservata la mancanza di alcuni amminoacidi in corrispondenza delle terminazioni della catena proteica e l'assenza di alcuni atomi sulla superficie della proteina. Questi errori, riportati per iscritto nei file PDB e derivanti dal processo di cristallizzazione dell'enzima, non hanno particolare importanza, poiché non influiscono nel processo di docking. Tuttavia se i programmi non rispondessero bene al primo tentativo, si può procedere con l'aggiunta manuale degli atomi mancanti.

Scelte le strutture cristallografiche ho dovuto cercare il programma che mi permettesse di eseguire il miglior docking sulle cicloossigenasi, poiché ogni programma si può adattare meglio o peggio alla proteina su cui lavora. Per fare ciò mi sono affidato ai valori di RMSD prodotti dal docking del ligando con cui la proteina è cristallizzata (flurbiprofene per la COX-1 e acido arachidonico per la COX-2). L'RMSD è la deviazione quadratica media (root mean square deviation) misurata tra la conformazione generata dal docking e quella di riferimento (fig.3). Minore è questo valore, maggiore è la somiglianza tra conformazione generata e conformazione di partenza.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [(X_i - X_0)^2 + (Y_i - Y_0)^2 + (Z_i - Z_0)^2]}{n}}$$

Fig.3: Formula utilizzata dal programma "MOE" per calcolare l'RMSD;  $X_i$ ,  $Y_i$  e  $Z_i$  sono le coordinate spaziali di un atomo della conformazione generata dal docking, a cui sono sottratte le coordinate spaziali dello stesso atomo presente nella conformazione iniziale  $X_0$ ,  $Y_0$  e  $Z_0$ . Tutto ciò calcolato per  $n$  atomi.

I programmi che ho testato per avere il minor valore di RMSD sono MOE, GOLD, PLANTS e GLIDE. Il migliore valore di RMSD è stato fornito dall'estensione GLIDE di MAESTRO (RMSD minore di 1) sia nella COX-1 che nella COX-2, dunque, per eseguire i docking mi sono affidato a MAESTRO, mentre per la preparazione della proteina e dei ligandi e per l'analisi dei risultati ho utilizzato MOE, che ha una maggior facilità di impiego.

## 4.2 - Preparazione della proteina e dei ligandi

I file PDB non contengono gli atomi di idrogeno e riportano solamente le coordinate spaziali degli altri atomi. Per eseguire le varie simulazioni è necessario perciò protonare e calcolare le cariche parziali della proteina ed eliminare elementi inutili al fine di ottimizzare i tempi di calcolo. Per questi motivi prima di eseguire qualsiasi simulazione di docking è stata seguita una procedura di preparazione della proteina e del ligando cristallizzato con essa (attraverso MOE):

- 1- Eliminare eventuali sequenze proteiche in più per avere un unico monomero
- 2- Eliminare le molecole di acqua
- 3- Salvare il ligando in un altro file, eliminandolo da quello della proteina
- 4- Protonare
- 5- Ottimizzare l'energia degli idrogeni aggiunti
- 6- Calcolare le cariche parziali con AMBER99
- 7- Eliminare se non necessari coenzimi e cofattori
- 8- Salvare con estensione “.mol2”

Per preparare il ligando sul quale eseguire il docking ho seguito invece il seguente metodo:

- 1- Disegnare il ligando
- 2- Protonare
- 3- Ottimizzare l'energia
- 4- Calcolare le cariche parziali con PM3
- 5- Salvare con estensione “.mol2”

NB: le cariche parziali sono conformazione-dipendenti, perciò ad ogni minimizzazione energetica sono state ricalcolate con PM3.

Dopo aver eseguito queste procedure di preparazione è stato necessario ottenere da GLIDE le coordinate del centroide, ovvero la media delle coordinate spaziali del ligando cristallizzato all'interno della proteina, da inserire in un file di griglia, ovvero un file dove il programma scrive le proprietà e la forma del sito attivo della proteina.

Dopo aver generato il file di griglia, GLIDE può eseguire il docking di qualsiasi inibitore utilizzando lo stesso file di griglia per il recettore. Eseguiti questi procedimenti preparativi sia per la COX-1 che per la COX-2 è possibile iniziare la simulazione computazionale.

GLIDE esegue una ricerca stocastica per il piazzamento, ovvero cerca una conformazione iniziale del ligando all'interno della proteina in modo casuale, muovendo successivamente il ligando in base alle interazioni con la proteina, in modo da ottimizzare le energie conformazionali. Per ogni docking sono state impostate in output 20 conformazioni e, attraverso l'impiego di alcuni file di script lanciati con MOE, sono state quantificate le interazioni di ogni conformazione col recettore. Questi valori di interazione elettrostatica (calcolati mediante un'equazione colombiana) e idrofobica (calcolati in base alla superficie di contatto col recettore) sono stati rappresentati graficamente con il programma GNUPLOT. Così facendo sono stati ottenuti per ogni inibitore quattro grafici di interazione: due riferiti alla COX-1 e due riferiti alla COX-2. Gli inibitori che tratteremo sono nove, perciò verranno riportati solo alcuni dei grafici prodotti dai docking, quelli che mostrano meglio le interazioni con l'enzima o che risultano più interessanti dal punto di vista concettuale.

### 4.3 - Acido arachidonico

Il docking dell'acido arachidonico ha fornito otto conformazioni nella COX-2 e solo una nella COX-1. Questo indica una maggior difficoltà del programma nell'eseguire il docking del substrato endogeno. Questa difficoltà si suppone sia dovuta al diminuire delle dimensioni del sito attivo man mano che si estende all'interno dell'enzima: nella COX-1, in particolare, il fenomeno risulta essere molto più vistoso. Tuttavia, se il risultato è paragonato alle prove eseguite con gli altri programmi di docking, è più che accettabile.

Di seguito sono riportate le immagini che illustrano le conformazioni dell'acido arachidonico nei due isoenzimi (Fig.4).

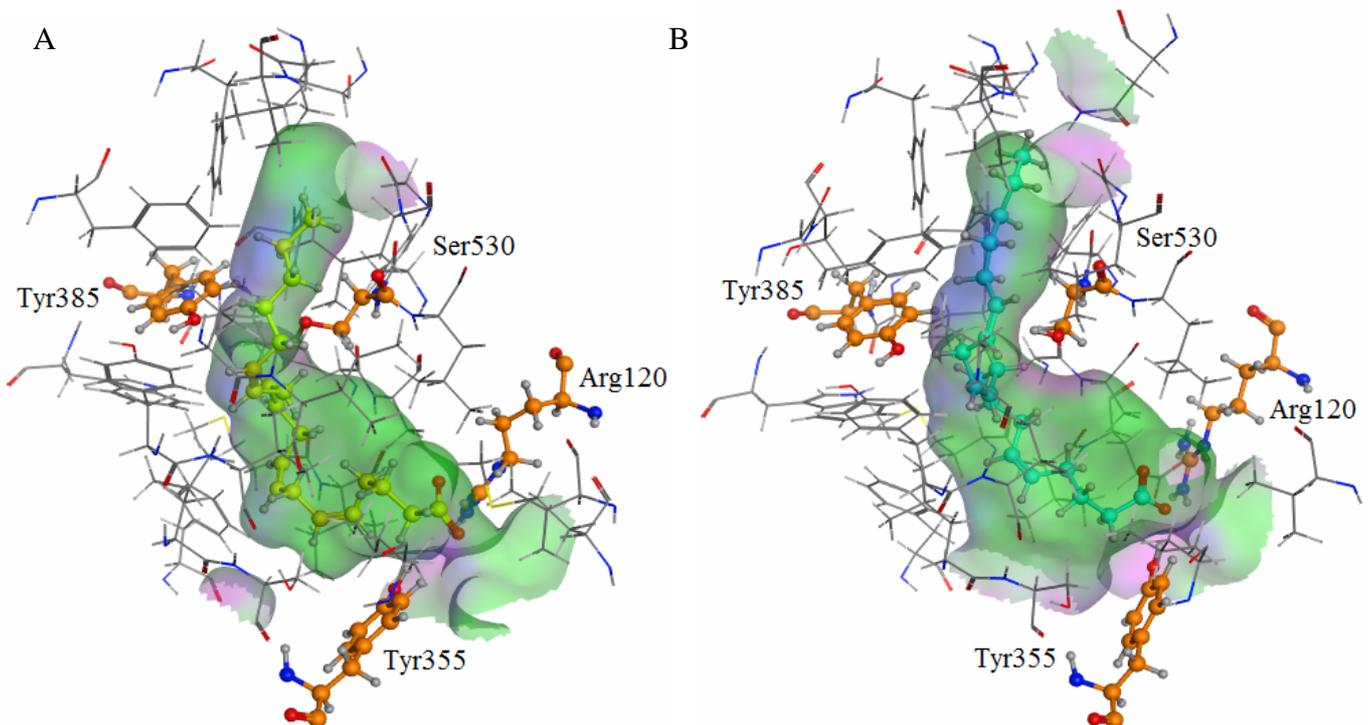


Fig.4: A) Conformazione derivante dal docking dell'acido arachidonico nella COX-1.

B) Conformazione con minor valore di RMSD derivante dal docking dell'acido arachidonico nella COX-2.

Sono state quantificate le interazioni elettrostatiche ed idrofobiche di tre conformazioni, riportate in figura 5. La prima di queste, indicata come PDB3HS5 (in ciano), riporta le energie di interazione dell'acido arachidonico cristallizzato nella COX-2 con il suo recettore. La seconda, indicata come AA3HS5 (in giallo), riporta le energie di interazione dell'acido arachidonico (conformazione con minor RMSD) con la COX-2. La terza, indicata come AA1CQE (in verde), riporta le energie di interazione dell'acido arachidonico con la COX-1

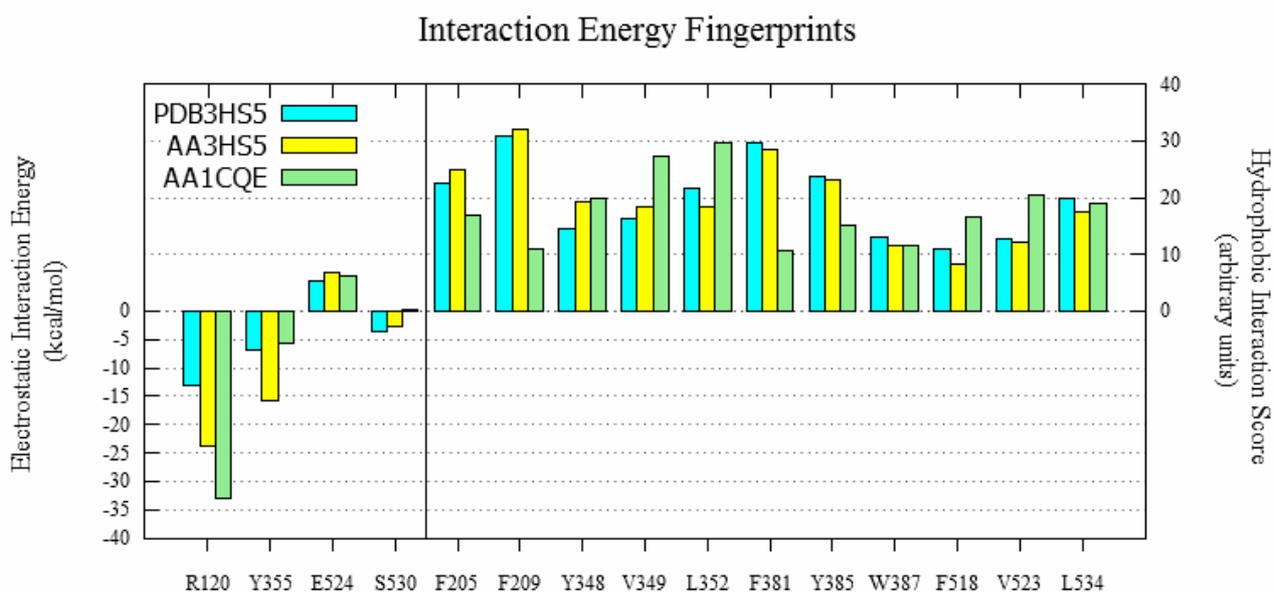


Fig.5: A sinistra del grafico sono riportati i valori di interazione elettrostatica, mentre a destra quelli di interazione idrofobica. Le interazioni elettrostatiche sono calcolate dal programma mediante un'equazione coulombiana che tiene conto della distanza e della carica degli atomi, mentre quelle idrofobiche sono punteggi arbitrari assegnati in base alla superficie di contatto.

Il punto di costrizione formato da Arg120, Tyr355 e Glu524 interagisce in modo vistoso col carbossilato dell'acido arachidonico. Possiamo inoltre notare, come riportato in letteratura, che l'interazione con Arg120 è più intensa nella COX-1 che nella COX-2. Per quanto riguarda le interazioni idrofobiche, ci sono punti in cui risultano migliori le conformazioni interne alla COX-1 e punti dove risultano migliori quelle interne alla COX-2.

## 4.4 - Aspirina

L'aspirina è stata uno dei primi farmaci impiegati per curare il mal di testa. Il suo meccanismo d'azione prevede un'inibizione di tipo irreversibile, che arresta le abilità catalitiche dell'enzima mediante l'acetilazione dell'amminoacido Ser530. L'acetilazione della proteina provoca infatti un'interruzione nell'estensione del sito attivo (Fig.6), che impedisce all'acido arachidonico di interagire con Tyr385, bloccando la sintesi delle prostaglandine.

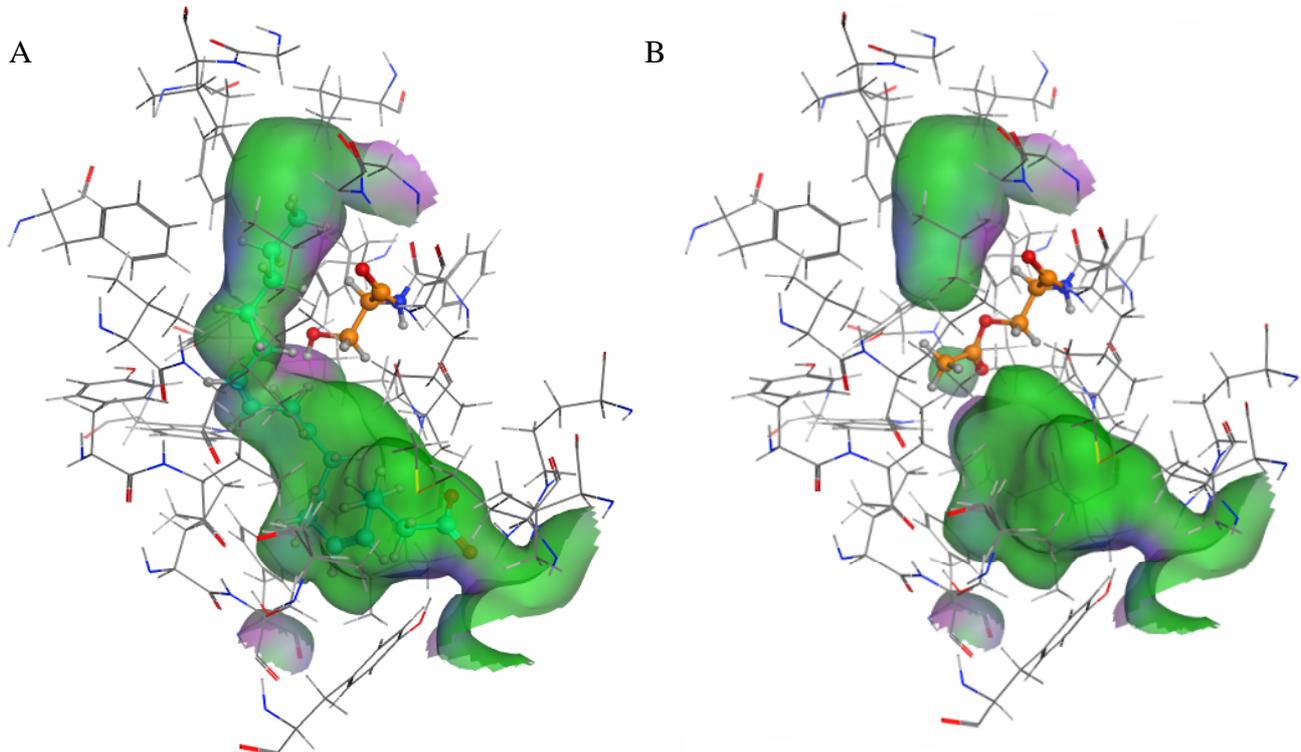


Fig.6

Fig.6: A) Rappresentazione grafica del sito cicloossigenasico della COX-1 (PDB 1CQE). Nel sito è contenuto l'acido arachidonico e si può notare Ser530 evidenziata in arancione.  
B) Rappresentazione grafica del sito cicloossigenasico della COX-1 (PDB 1CQE). Il sito è stato acetilato sull'OH di Ser530 (evidenziata in arancione) per fare notare l'interruzione dell'estensione interna della tasca dovuta a tale modifica.

La reazione di acetilazione ha un'efficacia tra 10 e 100 volte maggiore nella COX-1 che nella COX-2. Perché avvenga la reazione l'aspirina deve infatti attraversare il punto di costrizione formato da Glu524, Tyr355 e Arg120 e, con quest'ultima, instaurare un debole ponte salino, posizionandosi con il corretto orientamento spaziale a 5Å di distanza dalla Ser530. Avendo la COX-2 un volume di cavità superiore a quello della COX-1, la distanza e l'orientamento spaziale dell'aspirina vengono meno e la transacetilazione risulta meno efficace.

Il docking di questo farmaco ha fornito varie conformazioni che però non riescono a riprodurre le condizioni riportate in letteratura. Tuttavia sono riusciti a trovare il file PDB a cui la bibliografia si riferisce: il file in questione è PDB 1PTH e mostra come è disposto l'acido salicilico (a transacetilazione avvenuta) all'interno del sito attivo della COX-1 (Fig.7).

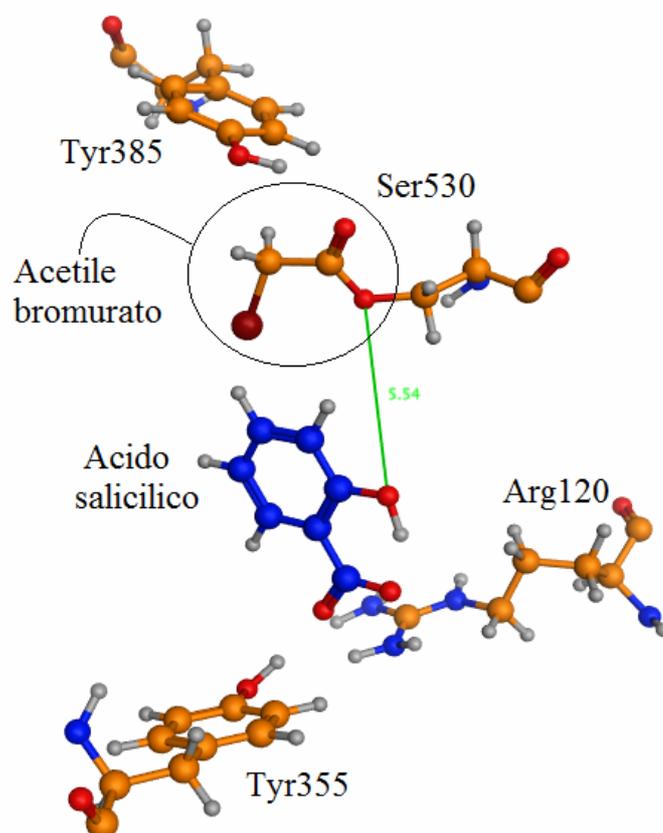


Fig.7

Fig.7: Rappresentazione grafica dell'acido salicilico all'interno di una cicloossigenasi 1 acetilata. L'acetile è bromurato, probabilmente per marcarlo durante la trans acetilazione.

## 4.5 - Ketoprofene

Il ketoprofene è un derivato dell'acido propanoico utilizzato spesso per contrastare il mal di testa ed è presente in molti farmaci come miscela racemica (Fig.8). Tuttavia solo l'isomero S è attivo nella cicloossigenasi e il nostro corpo converte una parte dell'isoforma R in S.



Fig.8

Il docking di questo inibitore ha fornito buoni risultati soprattutto nelle interazioni elettrostatiche col recettore. Infatti l'interazione con Arg120 assume valori intorno a -30 Kcal/mol sia nella COX-1 che nella COX-2.

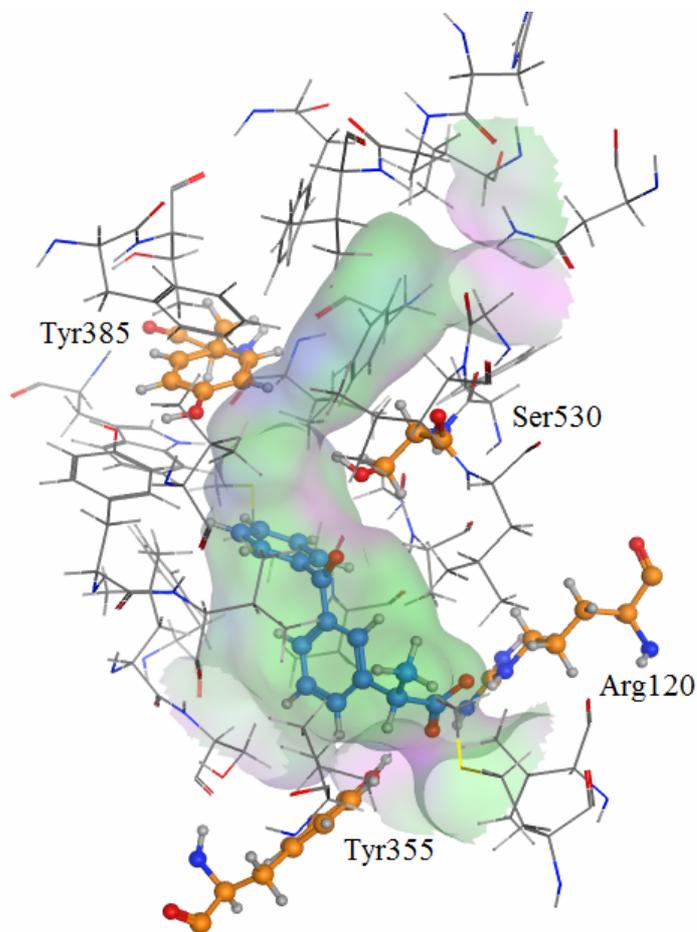


Fig.9: Rappresentazione grafica del ketoprofene all'interno della COX-2. La conformazione illustrata è la nona di quelle generate dal docking.

Questa forte interazione è apprezzabile in figura 10, dove sono quantificate le interazioni enzima-inibitore

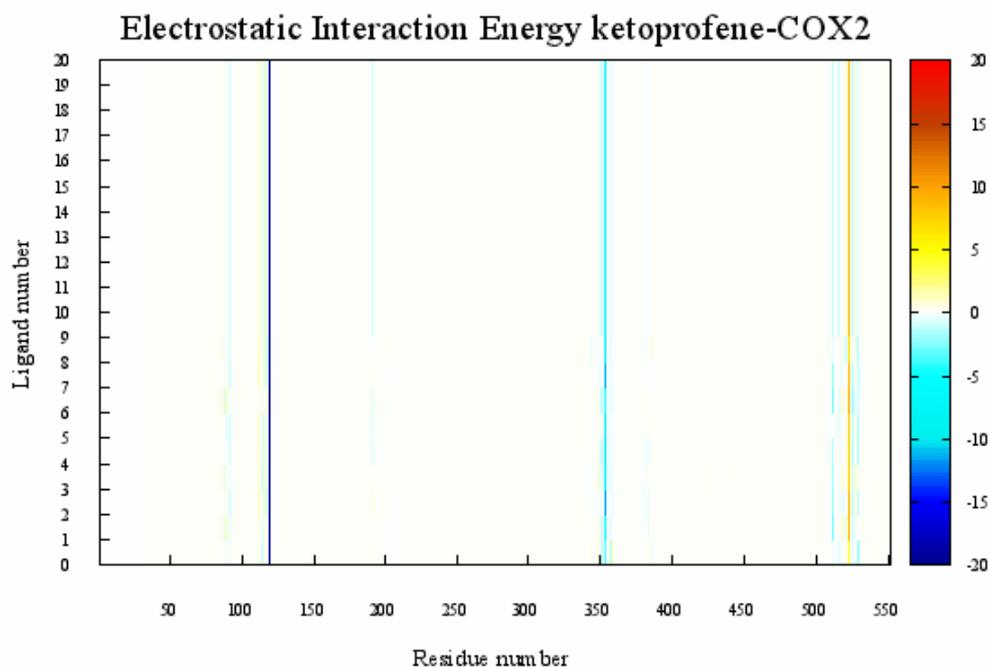


Fig.10

Il grafico sopra riportato illustra le interazioni elettrostatiche del ketoprofene con la COX-2. Nell'asse delle ascisse è riportato il numero dell'amminoacido della proteina e in quello delle ordinate sono riportate le conformazioni generate dal docking. La scala di colori quantifica l'interazione: più una riga tende al blu, maggiore è l'attrazione elettrostatica mentre più la riga tende al rosso, maggiore risulta la repulsione. Questo tipo di grafico, chiamato comunemente heatmap, ha il vantaggio rispetto agli istogrammi di riuscire a mostrare le interazioni di più ligandi o conformazioni con tutti i residui dell'enzima. In particolare, il grafico in figura 10 rappresenta egregiamente la situazione che tutti gli inibitori delle cicloossigenasi tendono a descrivere. La stessa cosa può essere fatta per le interazioni idrofobiche, assegnando un punteggio arbitrario di idrofobicità in base alla superficie di contatto tra inibitore e residui del sito attivo (Fig.11).

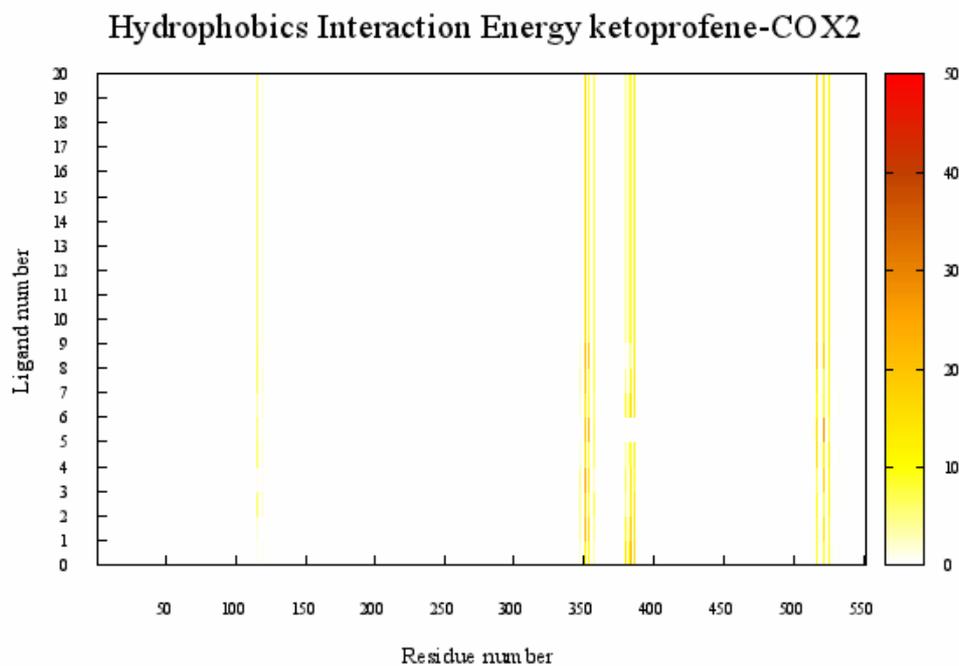


Fig11

Anche in questo caso si possono notare quali sono le regioni della proteina che danno le migliori interazioni con le conformazioni generate dal docking.

In questo caso le interazioni delle conformazioni generate dal docking sono molto simili tra la COX-1 e la COX-2, infatti il ketoprofene non è un inibitore COX-2 selettivo.

## 4.6 - Paracetamolo

Il paracetamolo è un farmaco appartenente alla famiglia dei FANS che possiede una spiccata azione antipiretica. La sua struttura non contempla gruppi carbossilici o altri gruppi funzionali che possano dare forti interazioni con i residui del sito attivo delle COXs (Fig.12). Per questo motivo, questo farmaco ha una debole attività inibitoria rispetto le cicloossigenasi e, di conseguenza, le dosi da somministrare per avere effetti sono molto più alte rispetto a quelle degli altri FANS.

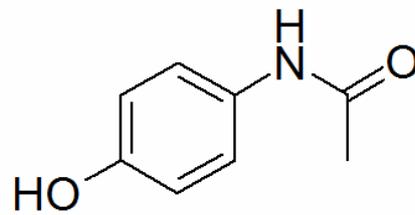


Fig.12

Le heatmap generate dal docking del paracetamolo mostrano infatti una diminuzione generale e vistosa delle energie di interazione con l'enzima (Fig.13).

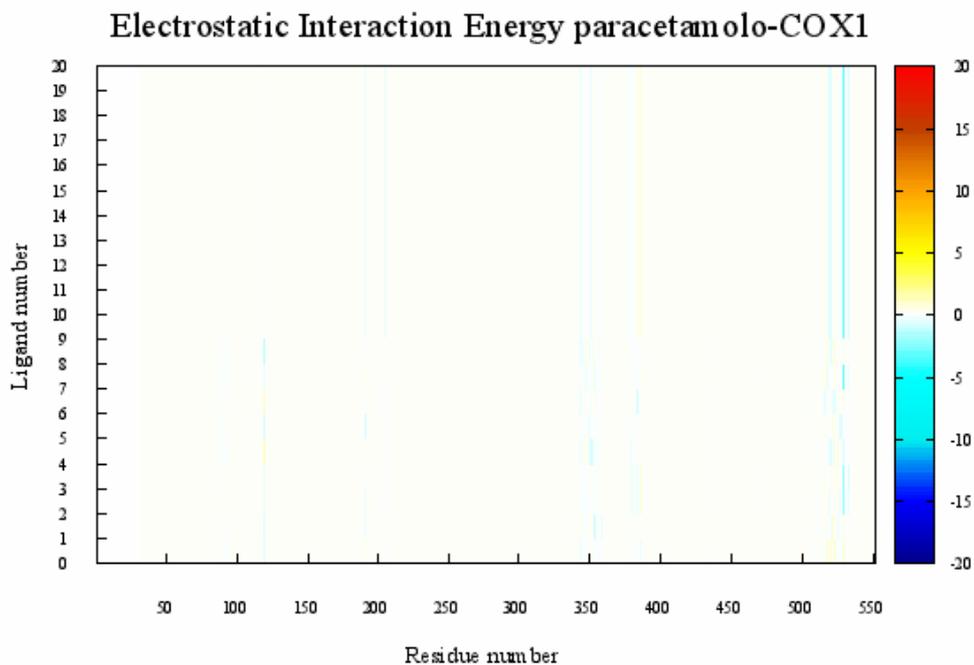


Fig.13

Per quanto riguarda le interazioni idrofobiche si può notare che la diminuzione è un po' meno vistosa. Nella COX-2 la diminuzione generale delle energie di interazione risulta ancor più amplificata, probabilmente a causa della maggior voluminosità del sito attivo dell'enzima.

Le conformazioni generate dai docking sono inoltre molto diverse tra loro. La spiegazione è che, non avendo gruppi funzionali molto affini alle COXs, questo inibitore possiede una certa mobilità all'interno del sito attivo dell'enzima.

Una ricerca più approfondita ha rivelato infatti che il paracetamolo è inattivo nelle COX, a meno che non sia in presenza di alcuni cofattori quali glutatione e idrochinone.

## 4.7 - Diclofenac

Il diclofenac, comunemente utilizzato per curare le infiammazioni muscolo-scheletriche, è un derivato dell'acido acetico. La sua struttura in qualche modo ricorda il ketoprofene (Fig.14).

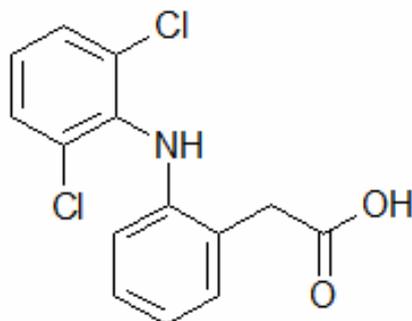


Fig.14

I risultati del docking sono un po' particolari: sebbene le interazioni idrofobiche con l'enzima siano più forti di quelle date dal ketoprofene (Fig.16), la stessa cosa non vale per le interazioni elettrostatiche, le quali rivelano una minore intensità dell'interazione con Arg120 (Fig.15). Questo può essere dovuto al fatto che il ketoprofene possiede un metile in più (rispetto al diclofenac) vicino al gruppo carbossilico, il quale migliora l'orientamento della struttura aumentando l'intensità dell'interazione con Arg120.

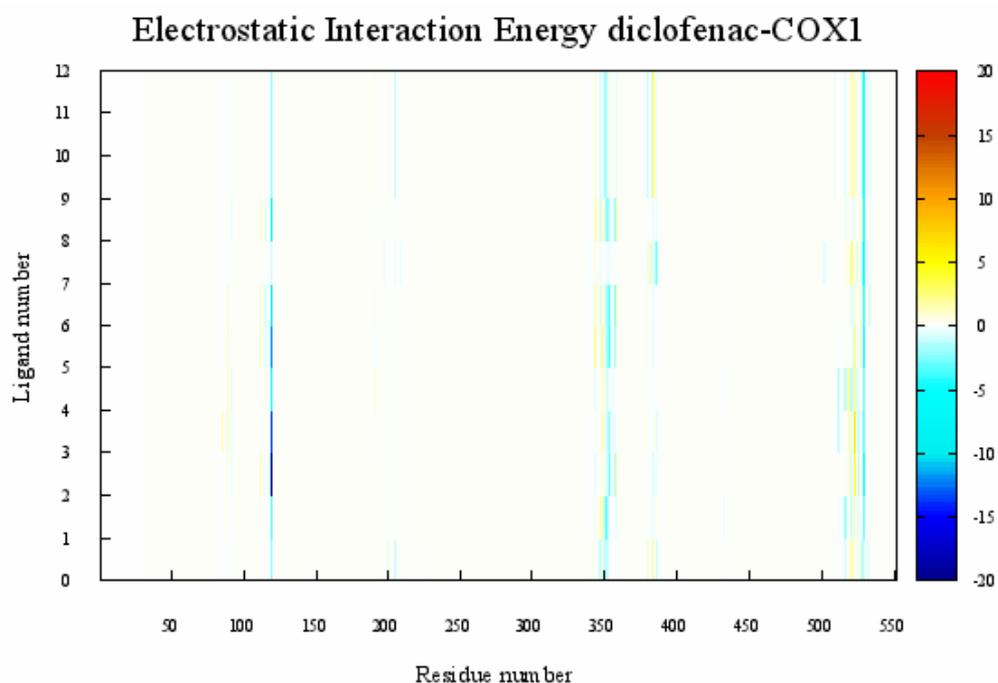


Fig.15

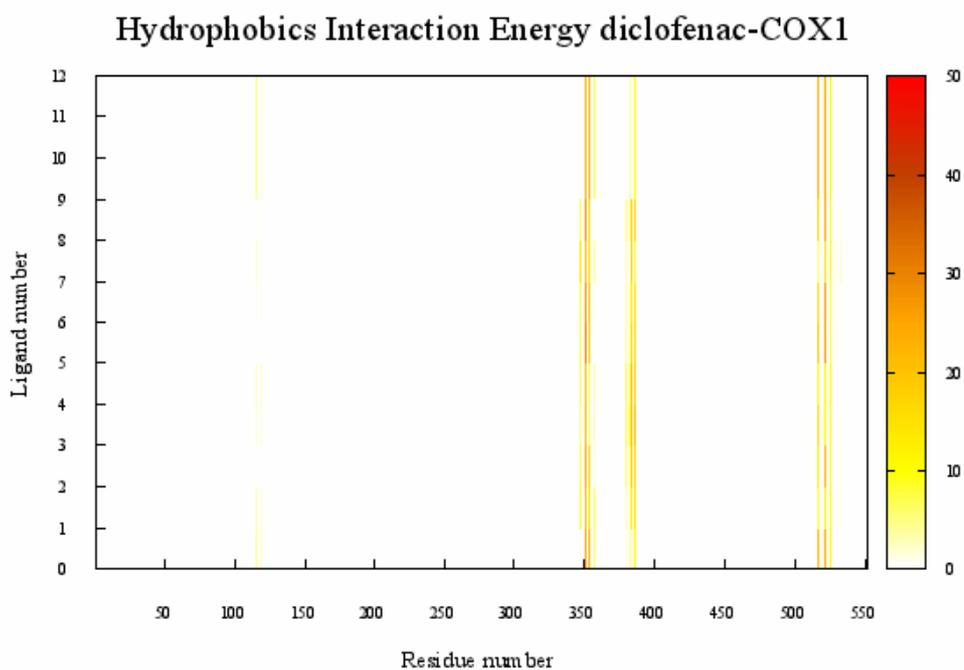


Fig.16

Inoltre le conformazioni generate nella COX-2 rivelano una maggior repulsione data da Glu524 in corrispondenza dei picchi di maggior attrazione con Arg120, peggiorando la stabilità della conformazione. Una delle conformazioni assunte dall'inibitore è visibile in Fig.17.

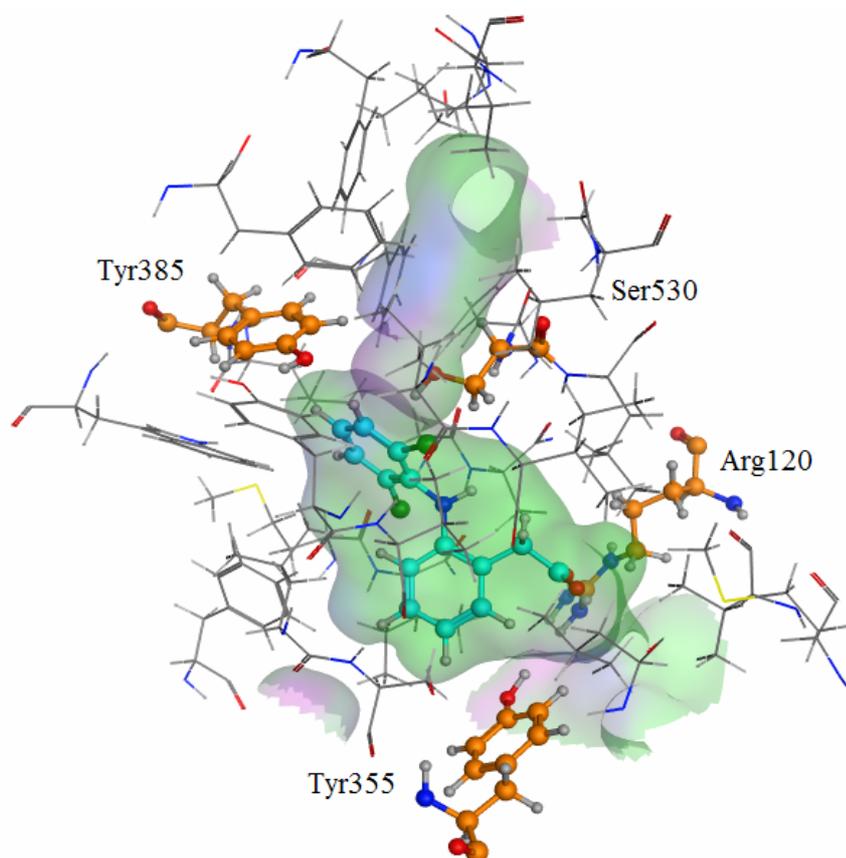


Fig.17: Rappresentazione grafica del diclofenac all'interno della COX-1. La conformazione illustrata è la terza di quelle generate dal docking.



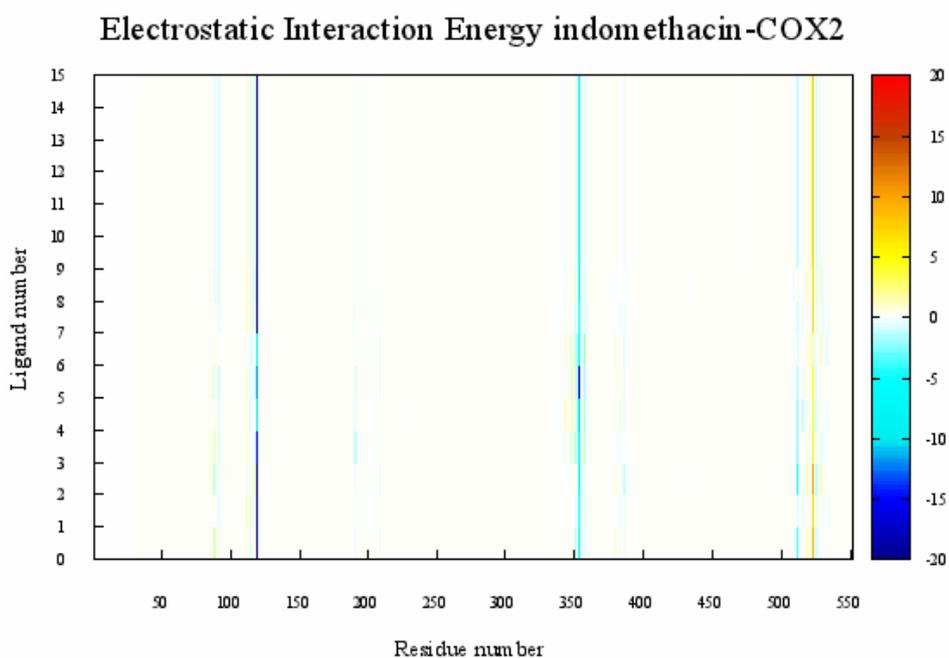


Fig.20

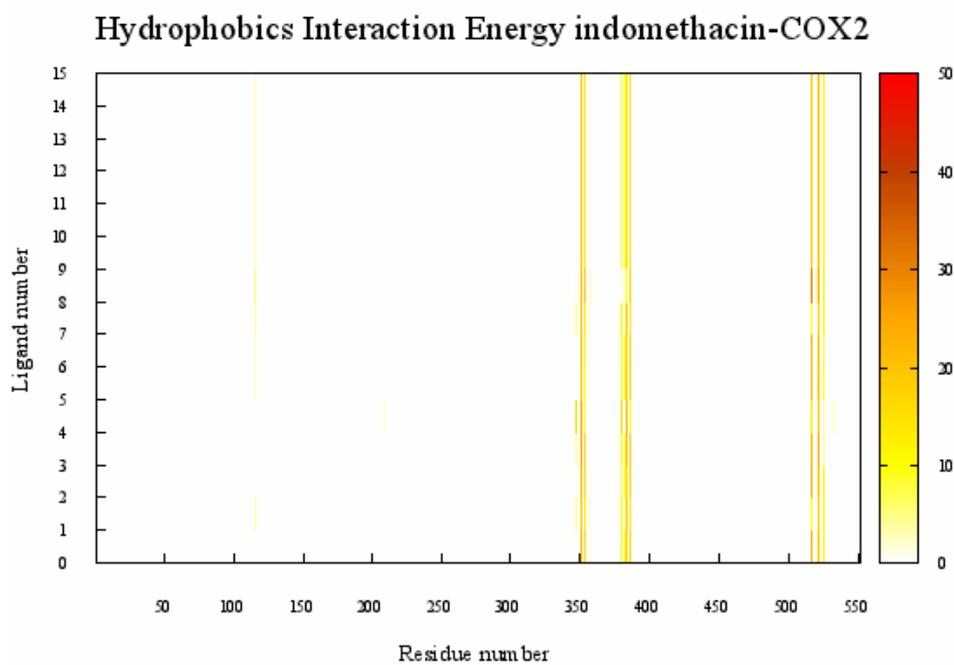


Fig.21

Di seguito è riportata una delle conformazioni assunte dall'indometacina nella COX-2 (Fig.22).

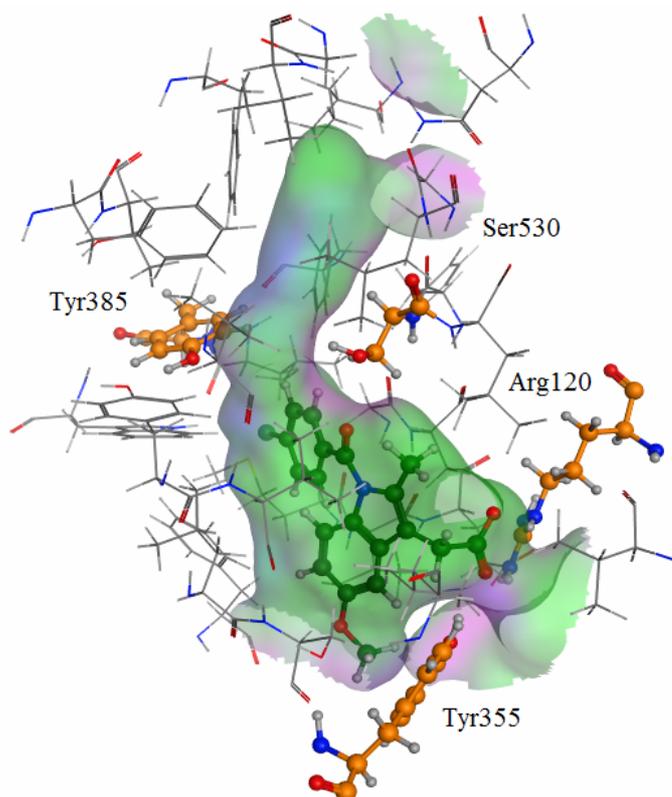


Fig.22: Rappresentazione grafica dell'indometacina all'interno della COX-2. La conformazione illustrata è la prima tra quelle generate dal docking.

## 4.9 - Ketorolac

Il ketorolac è un farmaco appartenente alla famiglia dei FANS impiegato soprattutto per le sue proprietà analgesiche: è stato dimostrato che l'azione analgesica di 30mg di ketorolac è paragonabile a quella di 12mg di morfina. Ciò suggerisce che questo farmaco non abbia solo implicazioni nell'inibizione delle cicloossigenasi e nella diminuzione del fenomeno iperalgesico ma anche in alcuni altri enzimi e/o recettori presenti nei nocicettori. La struttura di questo inibitore ha una forma particolare, che comunque imita tridimensionalmente quella di ketoprofene e diclofenac (Fig.23)

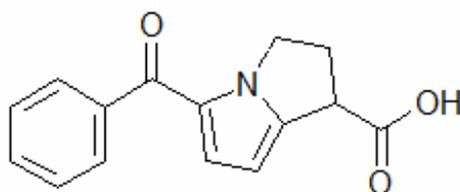


Fig.23

Questo farmaco mostra un lieve peggioramento delle interazioni elettrostatiche con Arg120 ma anche un notevole miglioramento di quella con Tyr355, soprattutto nella heatmap della COX-1 (Fig.24).

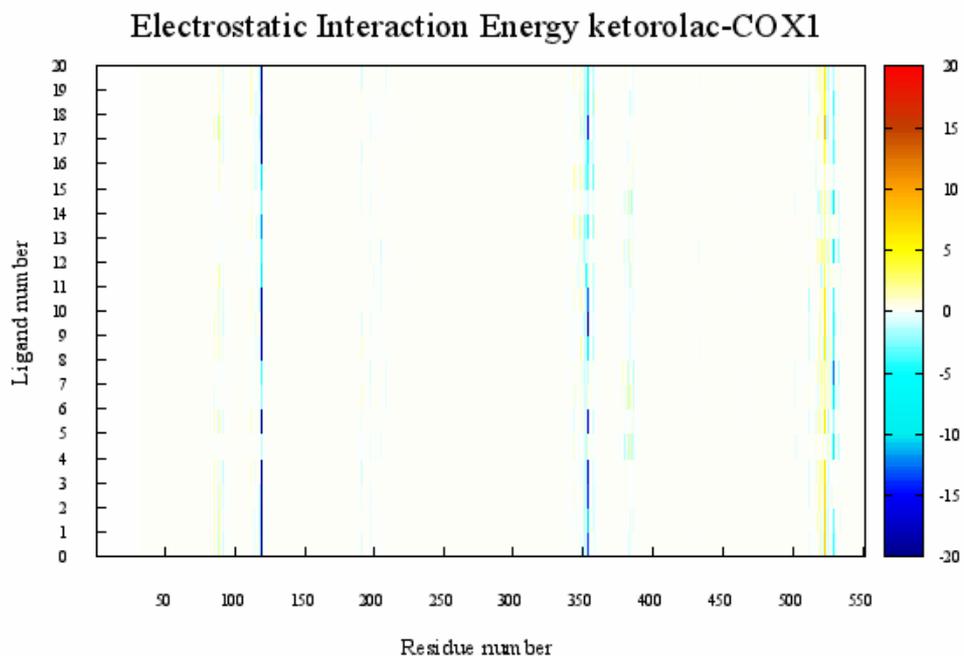


Fig.24

Per quanto riguarda le interazioni idrofobiche, queste sembrano essere molto simili a quelle del ketoprofene (Fig.11), anche se rivelano qualche lievissimo peggioramento. Di seguito è riportata una delle conformazioni assunte dal farmaco all'interno della COX-1 (Fig.25).

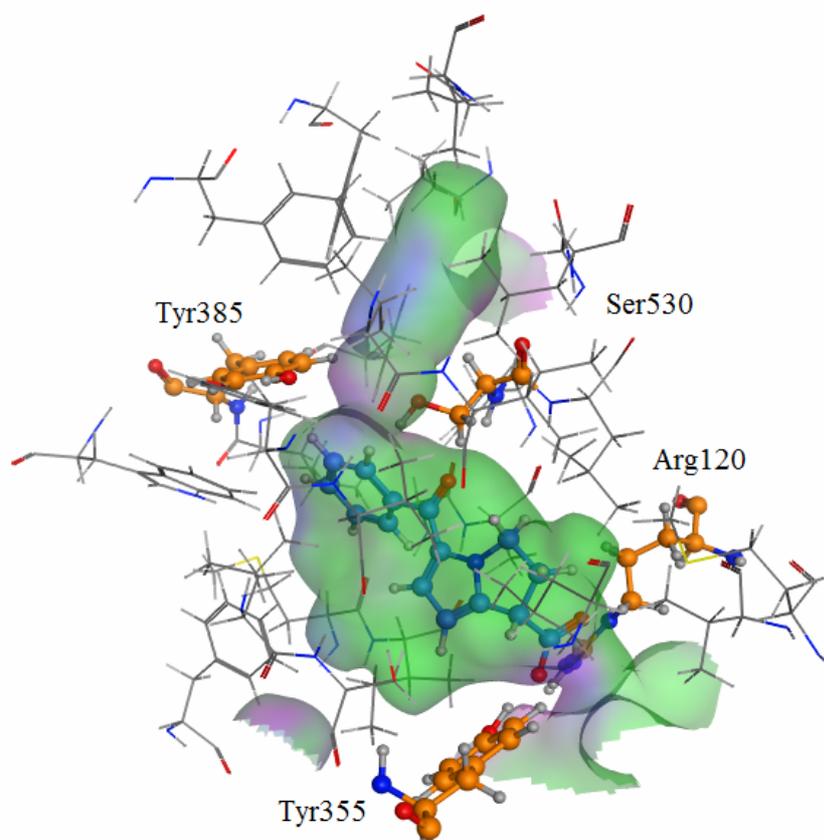


Fig.25: Rappresentazione grafica del ketorolac all'interno della COX-1. La conformazione illustrata è la decima tra quelle generate dal docking.

## 4.10 - Celecoxib

Il celecoxib è un inibitore COX-2 selettivo contenente al suo interno un gruppo solfonamidico e con struttura molto più ingombrante di quella dei comuni FANS (Fig.26).

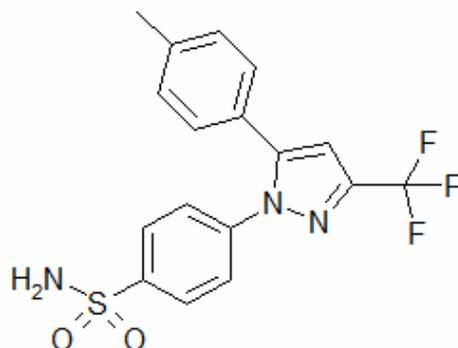


Fig.26

Essendo un inibitore COX-2 selettivo, il docking del celecoxib sulla COX-1 non ha avuto buon fine. GLIDE, infatti, non ha generato conformazioni all'interno di questa isoforma (Fig.27). Questo può essere l'effetto (come nel caso dell'indometacina) di un eccessivo ingombro sterico delle conformazioni generate all'interno dell'enzima.

```
JobDJ columns:
  C: Number of completed subjobs
  A: Number of active subjobs (e.g., submitted, running)
  W: Number of waiting/pending subjobs

 C A W | Activity  JobId  JobName  JobHost
-----|-----
 0 1 0 | launched  red-0-534d3fa6 glide-dock_SP_celecoxib-COX1-1 localhost [red]
 1 0 0 | finished  red-0-534d3fa6 glide-dock_SP_celecoxib-COX1-1 localhost [red]

All jobs are done.

Output poses file is missing from job: glide-dock_SP_celecoxib-COX1-1
WARNING: Glide produced no output structures for job: glide-dock_SP_celecoxib-COX1-1
WARNING: Subjob did not produce poses: glide-dock_SP_celecoxib-COX1-1

ERROR: Glide subjob(s) did not produce any poses
exiting...
```

Fig.27: Parte di un report generato da GLIDE, dove il programma riporta le attività che svolge e gli eventuali errori.

Le interazioni, quantificate per le conformazioni interne alla COX-2, sono molto diverse da quelle dei farmaci non selettivi. Infatti si può notare nelle heatmap generate che le interazioni elettrostatiche sono di minor intensità ma più numerose (Fig.28).

Inoltre è possibile apprezzare una maggior intensità delle interazioni idrofobiche (Fig.29), dovuta forse al fatto che i tre anelli aromatici della molecola (coniugati tra loro), fanno sì che vi sia una maggior superficie di contatto idrofobica tra enzima e inibitore.

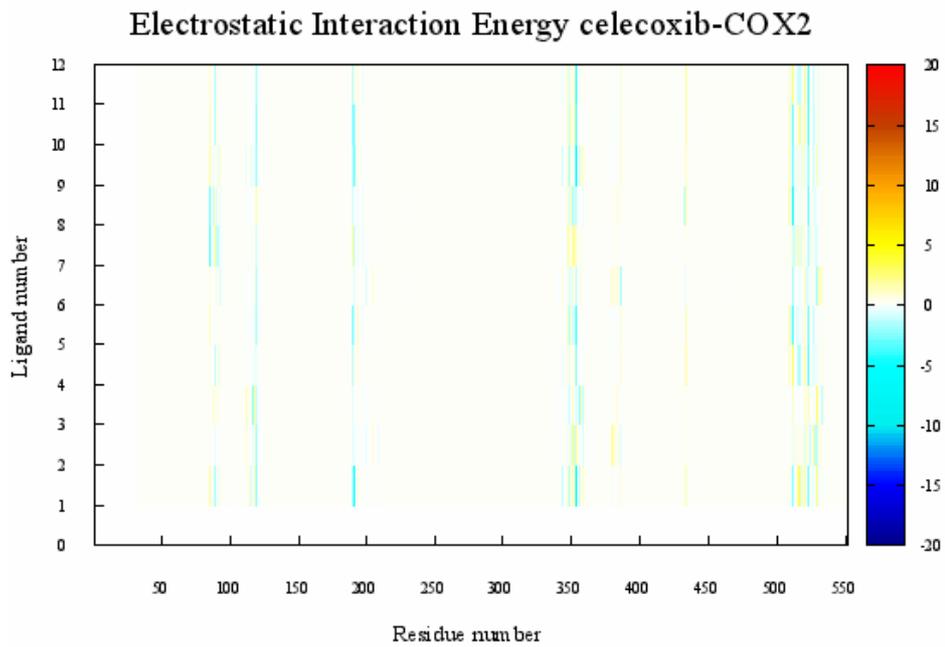


Fig.28

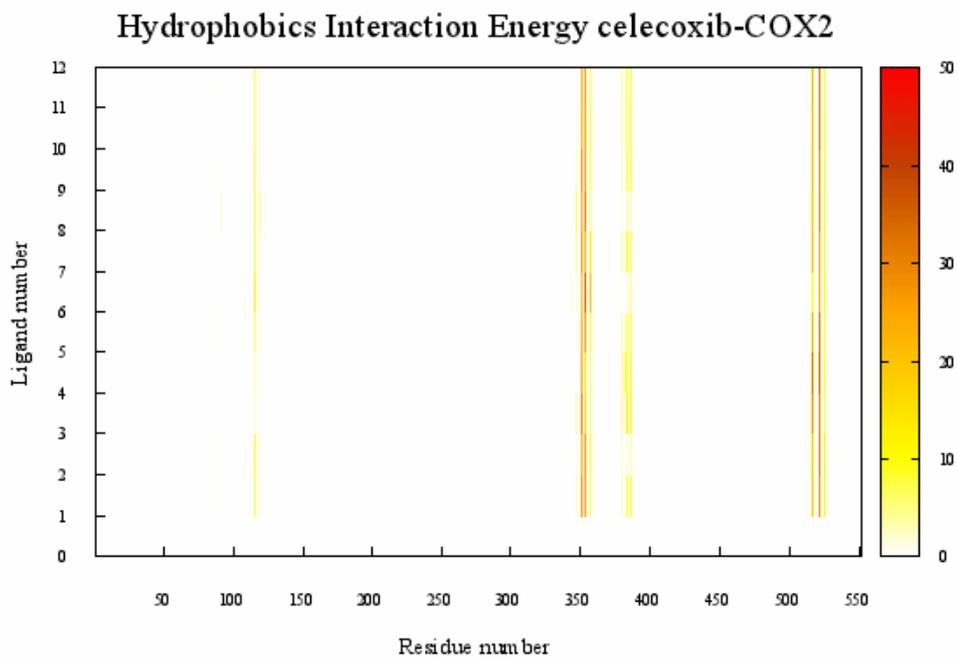


Fig.29

La conformazione assunta dal farmaco all'interno della COX-2 può essere osservata in Fig.30.

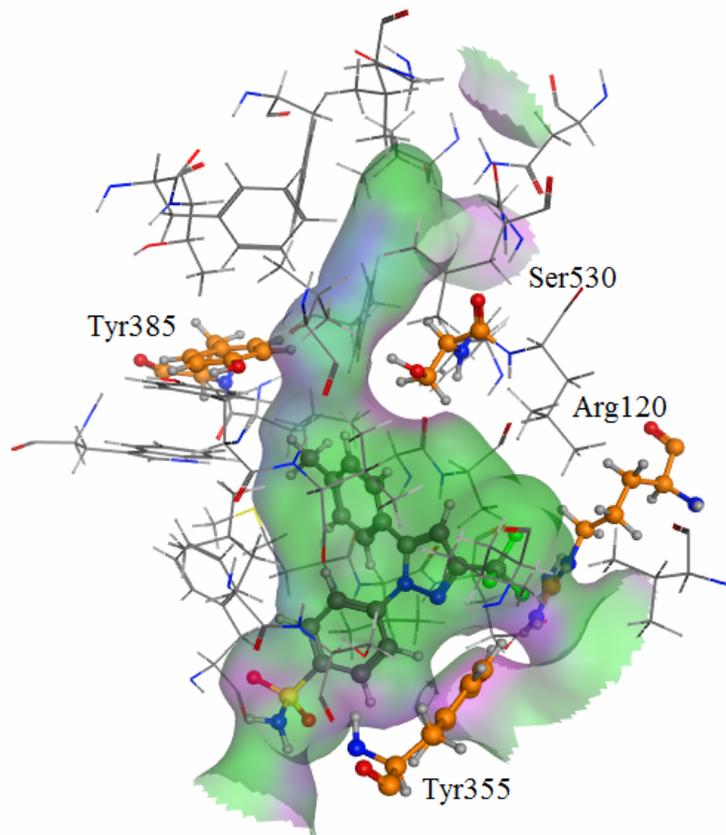


Fig.30: Rappresentazione grafica del celecoxib all'interno della COX-2. La conformazione illustrata è la sesta tra quelle generate dal docking.

## 4.11 - Firocoxib

Il Firocoxib, come il celecoxib, è un inibitore COX-2 selettivo. Questo però è unico nel suo genere, poiché utilizzato come anti-infiammatorio per cani e cavalli. La sua struttura, che contiene un ciclo propano (gruppo funzionale raro), è illustrata in Fig.31.

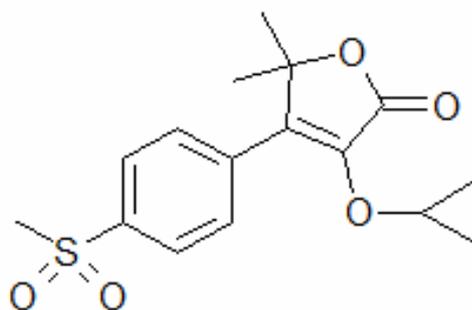


Fig.31

Questo farmaco non ha generato conformazioni valide nel docking della COX-1. Molto probabilmente, come nel caso dell'indometacina e del celecoxib, il programma rileva un eccessivo ingombro sterico e non riesce a eseguire il piazzamento dell'inibitore all'interno dell'enzima (Fig.32).



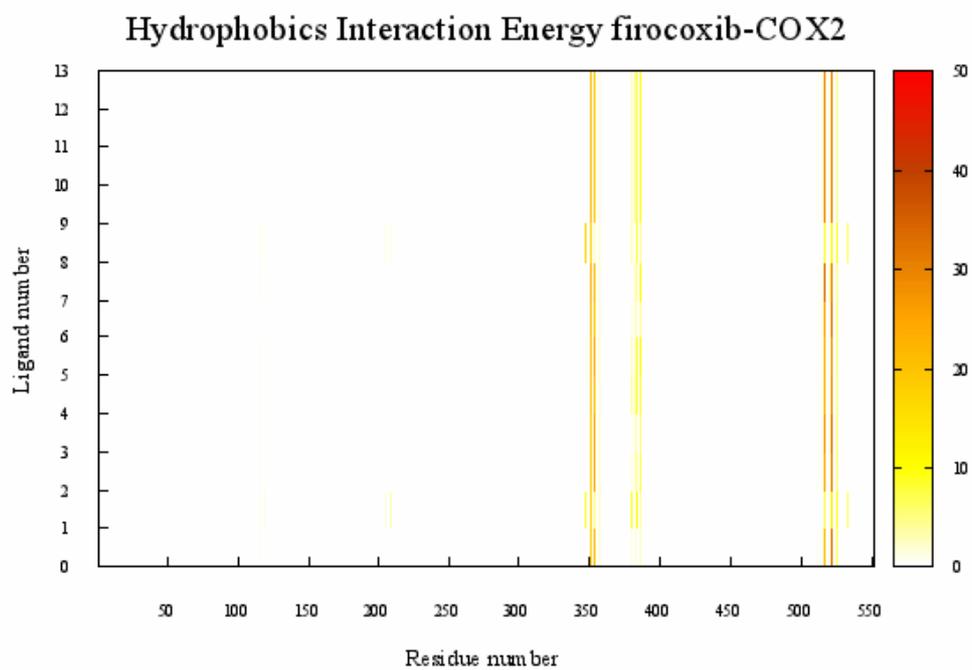


Fig.34

La conformazione assunta dal firocoxib all'interno della COX-2 è riportata di seguito in Fig.35.

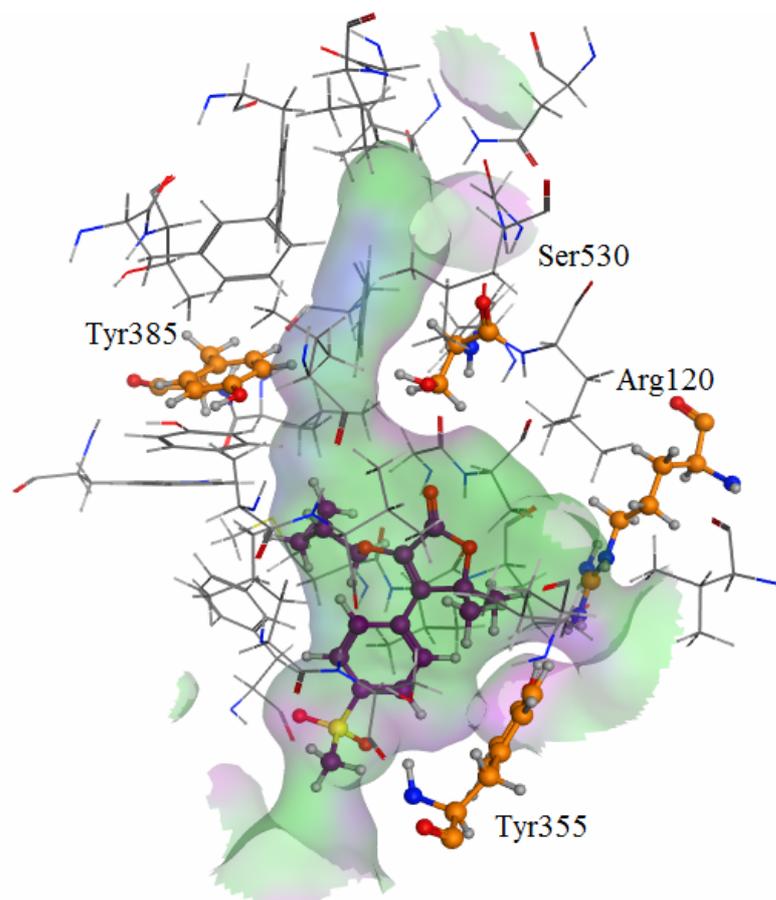


Fig.35: Rappresentazione grafica del firocoxib all'interno della COX-2. La conformazione illustrata è l'ottava tra quelle generate dal docking.

## 4.12 – Progettazione di nuovi farmaci: proposte $\beta$ e $\gamma$

Questa parte del lavoro è di tipo sperimentale. Dopo aver analizzato le interazioni che vengono a crearsi tra recettore e i vari inibitori commerciali, ora cercherò di elaborare un nuovo farmaco cercando di migliorare le interazioni enzima-inibitore o la geometria con cui questo farmaco si dispone all'interno dell'enzima. Ho provato pertanto a ragionare sulle possibili strutture di un potenziale nuovo inibitore analizzando le conformazioni assunte da indometacina e ketoprofene, cercando di ottenere una struttura che desse delle buone interazioni con gli amminoacidi presenti nel sito attivo della COX-2. In questo modo ho elaborato due potenziali inibitori:  $\beta$  e  $\gamma$  (Fig.36).

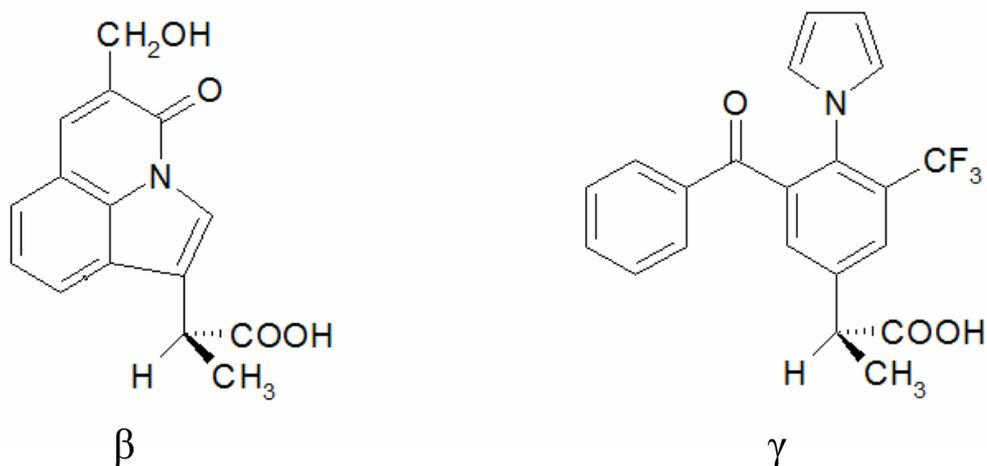


Fig.36

I nomi assegnati a queste strutture indicano rispettivamente la seconda e la terza struttura da me elaborate, con le quali ho eseguito simulazioni di docking.

I docking di questi farmaci hanno fornito risultati molto buoni, in particolare  $\beta$  può essere considerato un potenziale inibitore di entrambe le cicloossigenasi mentre  $\gamma$  rivela una certa affinità per la COX-2, quindi può essere considerato un potenziale farmaco COX-2 selettivo.

Il docking di  $\beta$  ha fornito delle ottime interazioni con la COX-1 (Fig.37 e Fig.38).

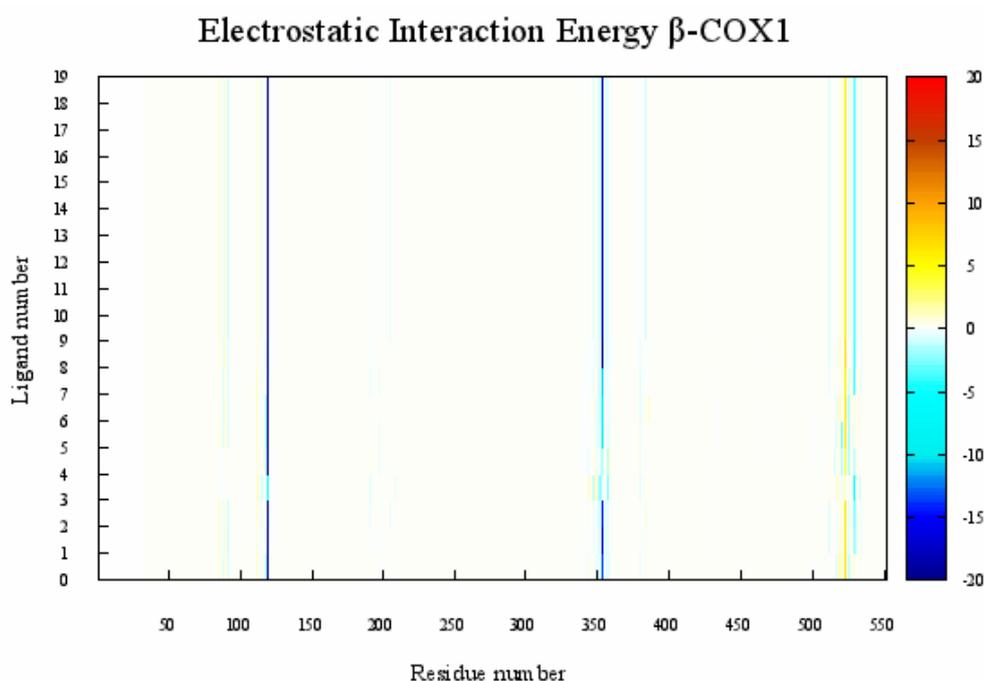


Fig.37

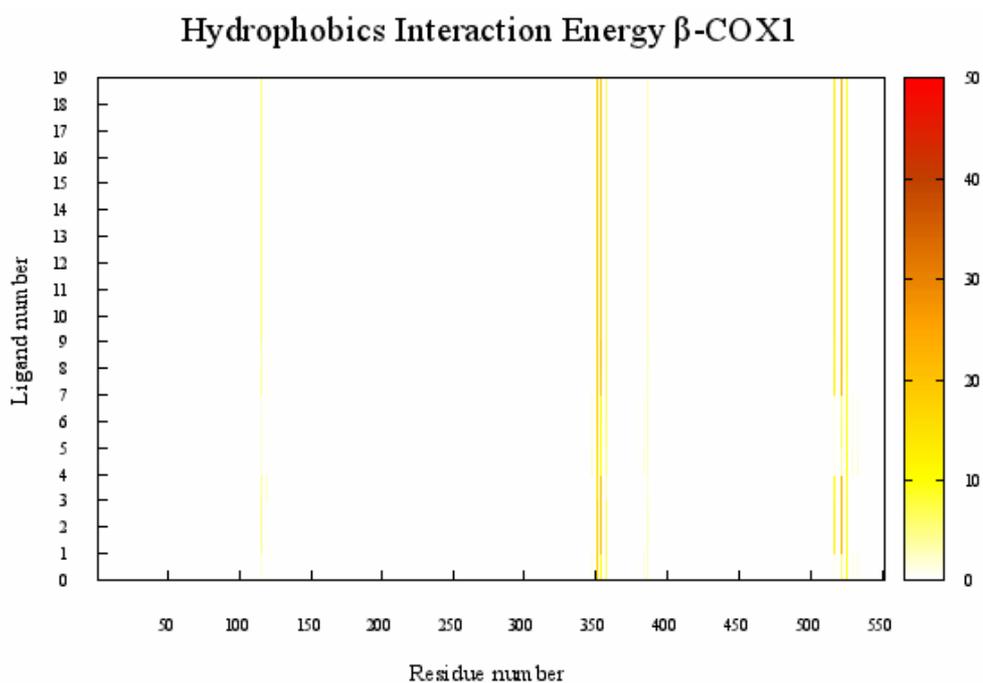


Fig.38

Di seguito è riportata una delle conformazioni assunta da  $\beta$  nel docking (Fig.39).

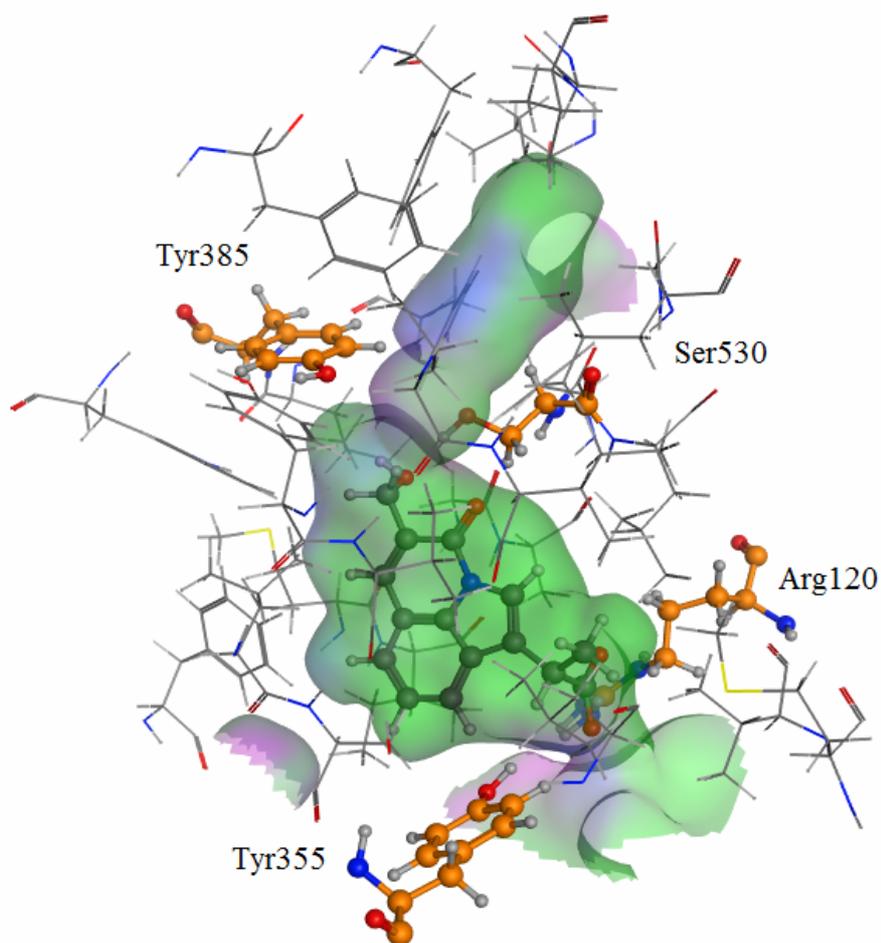


Fig.39: Rappresentazione grafica di  $\beta$  all'interno della COX-1. La conformazione illustrata è la tredicesima tra quelle generate dal docking.

Come già previsto, il docking di  $\gamma$  nella COX-1 non ha fornito conformazioni (Fig.40), questo rivela una certa difficoltà del programma nell'eseguire il docking di un farmaco così voluminoso in un sito attivo molto ristretto, associabile come vedremo in seguito ad una possibile selettività del farmaco.

```

JobDJ columns:
  C: Number of completed subjobs
  A: Number of active subjobs (e.g., submitted, running)
  W: Number of waiting/pending subjobs

  C A W | Activity  JobId  JobName  JobHost
  - - - | - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
0 1 0 | launched  orange-0-5399bcce glide-dock_SP_mario-cox1-01 localhost [orange]
1 0 0 | finished  orange-0-5399bcce glide-dock_SP_mario-cox1-01 localhost [orange]

All jobs are done.

Output poses file is missing from job: glide-dock_SP_mario-cox1-01
WARNING: Glide produced no output structures for job: glide-dock_SP_mario-cox1-01
WARNING: Subjob did not produce poses: glide-dock_SP_mario-cox1-01

ERROR: Glide subjob(s) did not produce any poses
exiting...

```

Fig.40: Parte di un report generato da GLIDE, dove il programma riporta le attività che svolge e gli eventuali errori.  
NB: il nome inizialmente assegnato a  $\gamma$  era "Mario".

Per quanto riguarda la COX-2,  $\gamma$  risponde bene al docking e da ottime interazioni elettrostatiche e idrofobiche con l'enzima (Fig.41 e Fig.42). Le interazioni di tipo elettrostatico forniscono risultati simili al docking del ketoprofene, mentre quelle di tipo idrofobico forniscono risultati leggermente diversi da quelli del celecoxib.

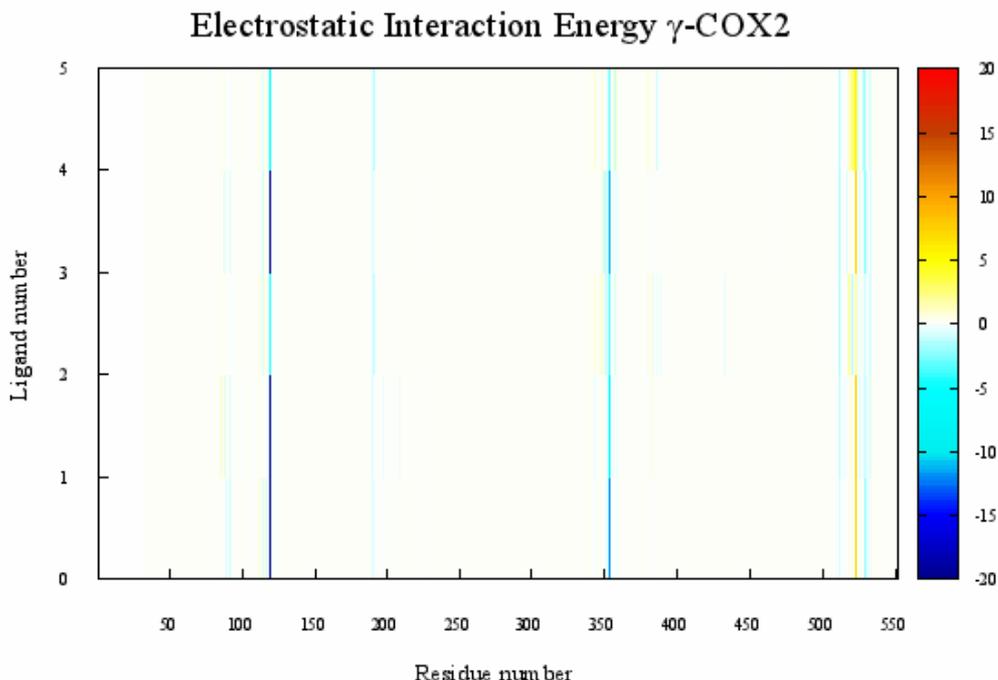


Fig.41

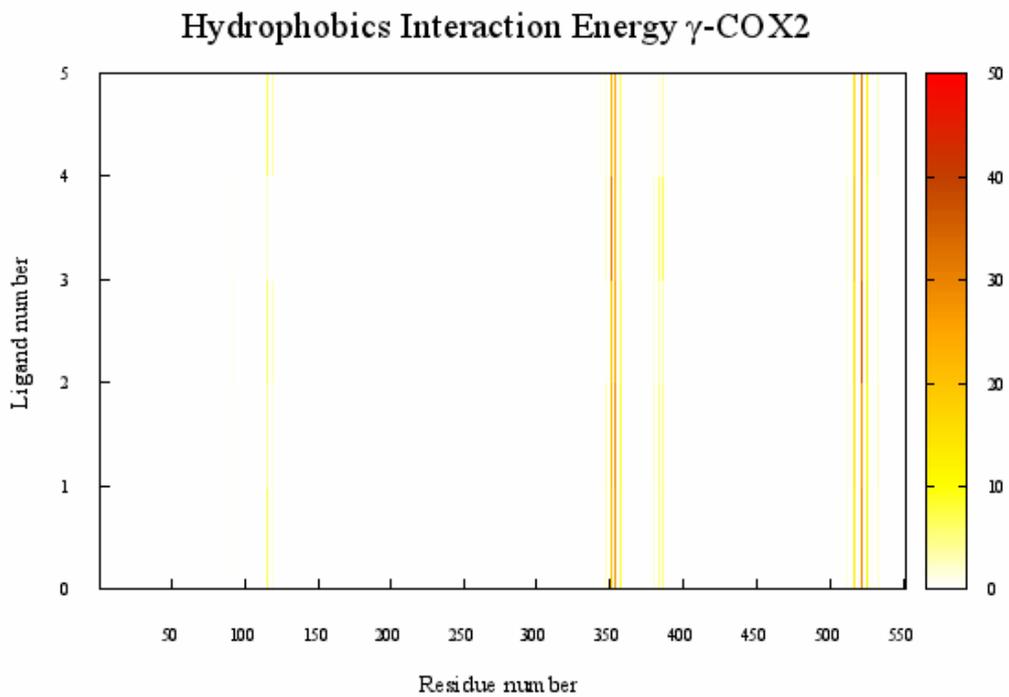


Fig.42

In figura 43 e 44 è riportata una sovrapposizione tra la COX-1 e la COX-2, che mostra la come si dispone la conformazione numero 2 (generata dal docking di  $\gamma$ ) all'interno dei due recettori.

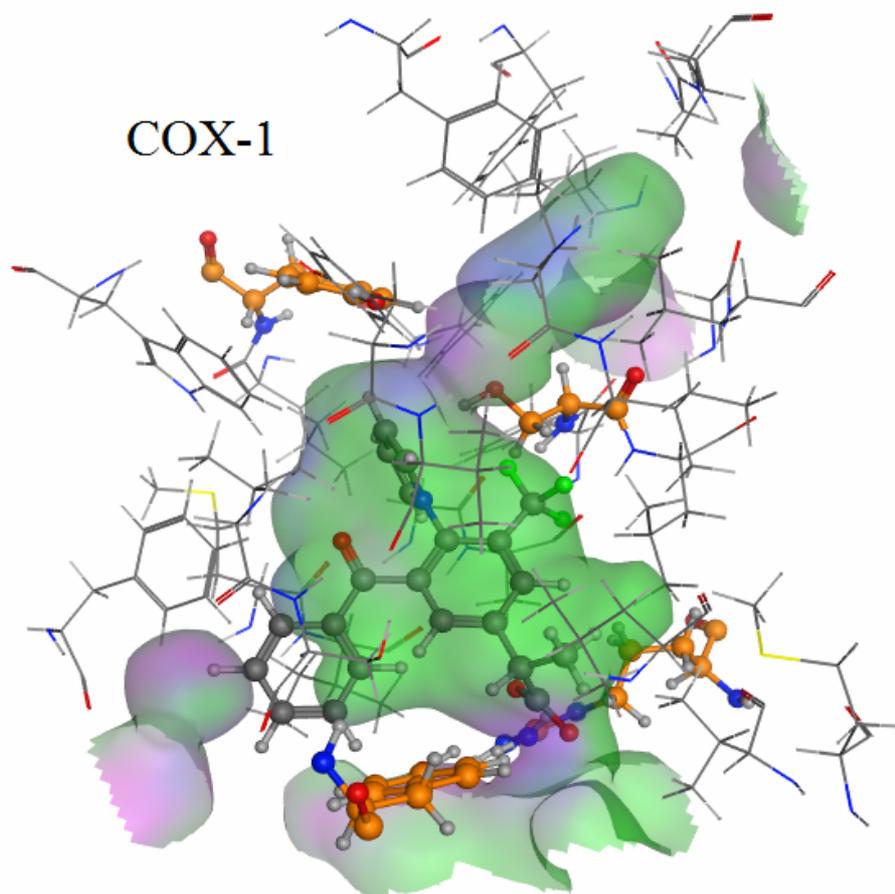


Fig.43

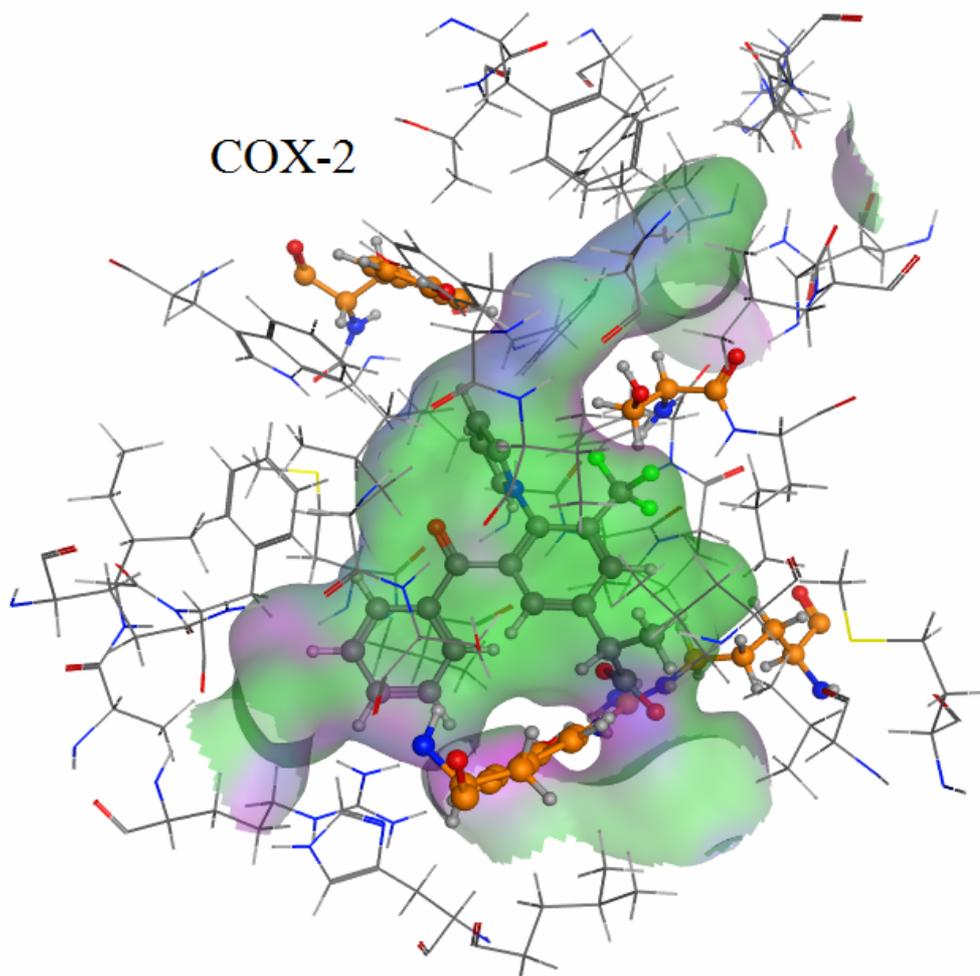


Fig.44

È evidente che l'inibitore proposto non può entrare all'interno della COX-1 a causa della maggior voluminosità rispetto al sito attivo. Per questo motivo  $\gamma$  potrebbe essere proposto come inibitore COX-2 selettivo. Tuttavia il limite del docking è quello di riferirsi a condizioni statiche per cui, prima di affermare che  $\gamma$  sia un inibitore selettivo, bisognerebbe eseguire altre simulazioni computazionali in condizioni dinamiche.

Inoltre, per poter mettere sul mercato farmaci studiati con metodi computazionali è necessario svolgere prima numerose verifiche, tra cui:

- Controllare se il farmaco è sintetizzabile e se la sintesi è economicamente conveniente
- Controllare se il farmaco interagisce fortemente con il recettore anche in vitro
- Eseguire test tossicologici sugli animali per verificare che il farmaco non abbia gravi effetti collaterali
- Provare il farmaco sui pazienti che ne hanno bisogno e che accettano cure sperimentali

Se il farmaco fornisce buoni risultati in tutte le verifiche può essere commercializzato, altrimenti bisogna elaborare nuove strutture al computer e ritentare.

# 5 - RISPOSTE DELL'ORGANISMO

## 5.1 - Recettori

Le prostaglandine hanno la funzione di segnalatori chimici, informando le varie cellule sul cosa devono fare. Per questo motivo esistono vari recettori che, legando le prostaglandine, vengono attivati e producono uno specifico segnale che fa compiere alla cellula uno specifico lavoro.

Questi recettori vengono identificati con delle sigle a due lettere seguite da un numero. La prima lettera indica il tipo di prostaglandina che si lega al recettore, mentre la seconda indica che il recettore è un recettore di prostaglandine. Perciò la seconda lettera è sempre una P mentre la prima può essere T, I, D, E, o F in base al tipo di prostaglandina; ad esempio con la sigla EP indichiamo un recettore che lega PGE<sub>2</sub>. Il numero che segue la sigla a due lettere sta ad indicare la funzione del recettore, poiché possono esserci più recettori di una stessa prostaglandina; ad esempio i recettori EP si suddividono in EP1, EP2, EP3 ed EP4. Questi recettori sono generalmente accoppiati a proteine G ed i secondi messaggeri intracellulari che essi inducono a produrre possono essere di vari tipi, tra cui Ca<sup>2+</sup>, cAMP e inositolo trifosfato (Fig.1).

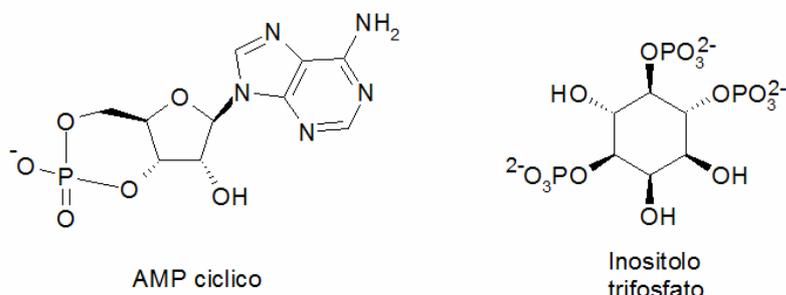


Fig.1

Esistono alcuni derivati delle classiche prostaglandine che possono attivare recettori presenti nel nucleo della cellula. Queste prostaglandine sono PGJ<sub>2</sub> e PGA<sub>2</sub>, le quali derivano rispettivamente da PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub> (Fig.2).

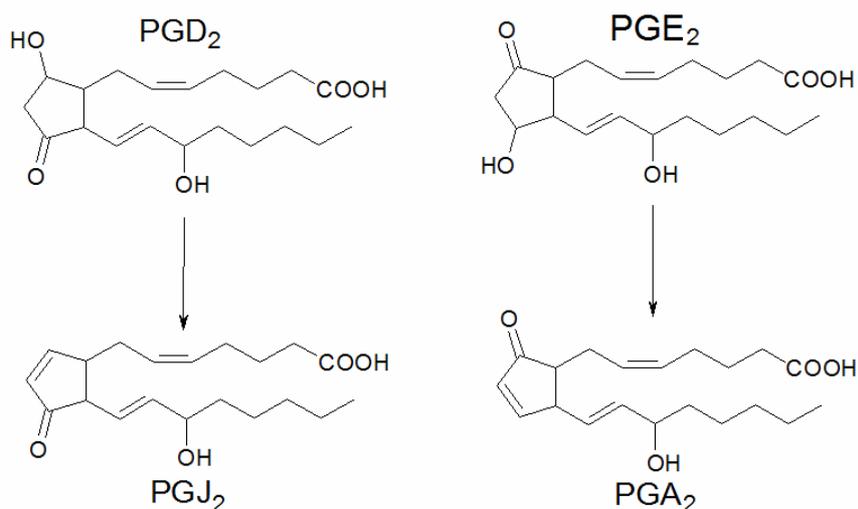


Fig.2

I recettori che legano queste particolari prostaglandine sono appartenenti alla classe PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors), i quali svolgono diverse funzioni: tra esse la regolazione della crescita della cellula, la sua differenziazione (che determina il tipo di cellula) e la regolazione del metabolismo. Il principale target di queste prostaglandine è PPAR $\gamma$ , il quale regola

le riserve e il metabolismo di zuccheri e acidi grassi. Oltre che verso PPAR $\gamma$ , PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> possono interagire con I $\kappa$ B chinasi, inibendola. Questa chinasi ha la funzione di attivare un fattore di trascrizione chiamato NF $\kappa$ B, la quale attività regola l'attivazione dei linfociti e stimola la crescita cellulare.

NB: Nella nomenclatura "PGE<sub>2</sub>" il 2 sta ad indicare il numero di insaturazioni della prostaglandina

## 5.2 - Apparato circolatorio

Le prostaglandine manifestano molti dei loro effetti sull'apparato circolatorio. Ci sono molte prostaglandine che interagiscono con recettori presenti nelle cellule endoteliali e nelle piastrine.

Le PGI<sub>2</sub> si legano ai recettori IP delle cellule endoteliali che, attraverso un sistema di proteine G, inibisce la contrazione della cellula provocando la vasodilatazione, fenomeno molto importante soprattutto durante l'infiammazione. Al contrario, PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub> possono provocare sia vasodilatazione che vasocostrizione, in base al sottotipo di recettore a cui si legano. Inoltre PGI<sub>2</sub> si può legare ai recettori IP delle piastrine entrando in contrasto con il processo di aggregazione piastrinica. Per questi motivi la presenza di PGI<sub>2</sub> è fondamentale nella regolazione dell'omeostasi vascolare e nell'inibizione della trombosi. PGE<sub>2</sub> è invece un potentissimo vasodilatatore poiché il suo effetto sui recettori EP<sub>2</sub> produce una risposta più forte di quella dei recettori IP, amplificando il rilassamento delle cellule endoteliali.

Le piastrine contengono solo COX-1, le quali portano alla rapida produzione di TXA<sub>2</sub>, che agisce a sua volta come potente agente di aggregazione attivando i recettori TP e si trasforma in TXB<sub>2</sub> (forma inattiva), con un tempo di emivita di circa 30s. Questo è l'esatto contrario dell'effetto prodotto con l'attivazione dei recettori IP e i due meccanismi uniti regolano l'omeostasi di aggregazione piastrinica.

L'assunzione di farmaci che inibiscono le cicloossigenasi comporta una diminuzione drastica sia della produzione di PGI<sub>2</sub> che della produzione di TXA<sub>2</sub>; tuttavia, la produzione di PGI<sub>2</sub> riprende dopo un tempo di circa 6 ore, mentre il ripristino della produzione di TXA<sub>2</sub> riprende dopo un tempo più lungo. Ciò comporta una maggior difficoltà di coagulazione dopo l'assunzione dei FANS. Per questo l'aspirina è una delle prime difese in caso di rischi di trombosi.

Normalmente le prostaglandine ad azione omeostatica sono prodotte dalle COX-1, la quale è presente in concentrazioni molto più elevate rispetto alla COX-2, la cui sintesi deve invece essere indotta da agenti esterni e comporta effetti molto diversi da quelli omeostatici della COX-1.

Un ruolo importante delle COX si manifesta inoltre nell'angiogenesi: le PGE<sub>2</sub> agiscono come potenti induttori dell'angiogenesi, anche se il loro meccanismo di azione non è ancora del tutto chiaro. Si suppone tuttavia che queste prostaglandine siano potenti induttori di un fattore di crescita chiamato VEGF (vascular endothelial cells growth factor), e che possano incrementarne l'espressione. I FANS sono dunque agenti che contrastano l'angiogenesi diminuendo l'espressione del VEGF.

Tutti questi fenomeni a livello cardiovascolare comportano effetti secondari negli altri organi del corpo umano. Ad esempio, una maggior vasodilatazione e una maggior stimolazione di VEGF comportano rispettivamente un maggior scambio gassoso e l'induzione della fibrogenesi nei polmoni, mentre la vasodilatazione comporta nei reni un maggior scambio di ioni, che permette la diminuzione della ritenzione salina. In tal modo, l'inibizione delle cicloossigenasi non comporta solo la diminuzione dei livelli di vasodilatazione e di aggregazione piastrinica, ma anche un minor apporto di ossigeno e problemi di ritenzione salina nei reni.

## 5.3 - Infiammazione

L'infiammazione è un fenomeno che si verifica quando l'organismo subisce un trauma causato da sforzi eccessivi o da agenti esterni. In tal caso la prima difesa dell'organismo consiste nel favorire un maggior apporto di sangue alla zona interessata e a rendere i vasi sanguigni più permeabili, in modo da favorire il trasferimento di leucociti dal sangue ai tessuti. Le prostaglandine maggiormente prodotte durante questo processo sono le PGE<sub>2</sub>, le quali hanno una più efficiente capacità vasodilatatoria. In minor concentrazione è sintetizzata anche PGI<sub>2</sub>. Durante questo processo la maggior parte delle cicloossigenasi espresse è rappresentata da COX-2, mentre se il trauma e l'infiammazione sono più gravi, si può trovare una concentrazione di COX-1 maggiore di quella di COX-2.

## 5.4 - Febbre

L'induzione della febbre è un fenomeno mediato dalla PGE<sub>2</sub> e ha origine dalla presenza di corpi estranei all'interno dei vasi sanguigni, soprattutto in presenza di LPS. I LPS (lipopolisaccaridi) sono costituenti della membrana esterna dei batteri Gram negativi, i quali si distinguono dai batteri Gram positivi che possiedono una membrana esterna di peptidoglicano.

I macrofagi e i leucociti presenti nel sangue, dopo aver rilevato la presenza di LPS (o di altri elementi estranei) e aver dato il via alla risposta immunitaria, producono citochine. Alcune di queste agiscono da segnale di allerta per le cellule delle pareti endoteliali, le quali avviano la produzione di COX-2 e la conseguente espressione di PGE<sub>2</sub>. A questo punto le PGE<sub>2</sub> prodotte dalle cellule cerebrali possono uscire dalle pareti dei vasi sanguigni e raggiungere i recettori EP3 dei neuroni ipotalamici, provocando una sovrapproduzione di AMP ciclico che interferisce nell'omeostasi termica dell'organismo. Questo meccanismo di innalzamento della temperatura è impiegato dal corpo per diminuire le capacità riproduttive degli agenti patogeni ed è facilmente inibito dal paracetamolo. Il meccanismo d'azione del farmaco non è ancora del tutto chiaro, poiché il paracetamolo non inibisce le cicloossigenasi come i comuni FANS, ma necessita di cofattori quali glutatione e idrochinone (Fig.3).

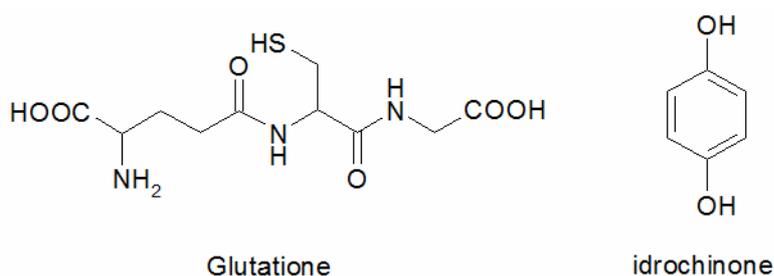


Fig.3

La mediazione della risposta piretica avviene senza l'intervento della COX-1, per cui i più forti farmaci ad azione antipiretica risultano essere inibitori COX-2 selettivi o comunque maggiormente affini alla COX-2.

## 5.5 - Cervello

Nel sistema nervoso centrale sono normalmente espresse le COX-1, queste sono presenti in maggior concentrazione nel cervelletto. Le COX-2, in questo apparato, vengono espresse soltanto se rilevata la presenza di agenti pirogenici, quale LPS. Pertanto la COX-2 è presente in concentrazioni molto basse nel cervello. Questi bassi livelli di concentrazione della COX-2 in condizioni normali, sono più alti nei neonati, probabilmente a causa dell'alta attività nervosa dei primi mesi di vita.

La maggior parte delle prostaglandine prodotte nel sistema nervoso sono PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>. Esse hanno funzioni opposte nella regolazione del sonno e nella regolazione della temperatura corporea. È stato dimostrato che microiniezioni di PGD<sub>2</sub> abbassano la temperatura corporea e inducono il sonno, mentre microiniezioni di PGE<sub>2</sub> provocano aumenti di temperatura e insonnia. Tuttavia, anche se è già stato scoperto che PGD<sub>2</sub>, agendo sui recettori DP accoppiati a proteine G, aumentano la produzione di cAMP, non è ancora del tutto chiaro il meccanismo secondo il quale le PGD<sub>2</sub> agiscano nella termoregolazione, come non è chiaro il meccanismo della regolazione del sonno da parte di entrambe le prostaglandine.

## 5.6 - Dolore

Le prostaglandine giocano un ruolo importante nella percezione del dolore. In particolare PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> hanno un ruolo fondamentale nell'incrementare la sensibilità dei nocicettori a stimolatori dolorifici, quali bradichinina e istamina. Questo fenomeno è chiamato iperalgesia.

Il meccanismo di azione di questa risposta prevede che le prostaglandine si leghino ai recettori EP ed IP posti sui nocicettori sensitivi e nel midollo spinale. Questo provoca l'attivazione dell'AMP ciclastasi e della fosfolipasi C, le quali modulano l'attività delle pompe ioniche nel neurone sensibilizzandolo. Uno degli effetti che si possono osservare (oltre all'iperalgesia) è, ad esempio, l'aumento della sensazione di calore, dovuta ad una sensibilizzazione del neurone causata dal recettore TRPV1, il quale viene attivato con bassi valori di pH, temperature maggiori a 42°C e dalla capsaicina, una molecola a carattere idrofobico presente nei cibi piccanti.

## 5.7 - Tratto gastro-intestinale

Le prostaglandine sono naturalmente prodotte in ogni punto del tratto gastrointestinale, in particolare la PGE<sub>2</sub> perché, attraverso l'interazione coi recettori EP1, ha la funzione di contrarre i muscoli lisci presenti in tutto l'apparato.

Inoltre è stato dimostrato che le prostaglandine, soprattutto PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, svolgono una funzione citoprotettiva (di protezione della mucosa gastrica). Il fenomeno è suddiviso in tre effetti specifici:

1- Entrambe le prostaglandine agiscono come vasodilatatori aumentando la quantità di sangue che entra a contatto con l'apparato, fattore che influisce positivamente sulla citoprotezione.

2- Sia PGE<sub>2</sub> che PGI<sub>2</sub>, agendo rispettivamente sui recettori EP3 ed IP, riducono la secrezione degli acidi gastrici. Quest'azione è dipendente della specie a cui ci si riferisce: nei cani PGE<sub>2</sub> provoca questa risposta in modo più accentuato di PGI<sub>2</sub>, mentre per i ratti è l'inverso.

3- È stato dimostrato che la somministrazione intragastrica di PGE<sub>2</sub> provoca un aumento della secrezione di muco il quale, oltre ad agire come barriera fisica sulla superficie dello stomaco, contiene bicarbonati secreti dalle cellule epiteliali dello stomaco che neutralizzano l'acido eccedente.

L'inibizione delle cicloossigenasi ha molto spesso come effetti collaterali la lesione delle pareti gastriche, data dall'assenza (in caso di inibizione) dei tre fenomeni sopra riportati. Tuttavia è stato

dimostrato che l'impiego di farmaci COX-1 o COX-2 selettivi non provoca quasi alcun effetto collaterale a livello gastrico, indice della presenza di entrambe le cicloossigenasi nell'omeostasi gastrica. Pertanto, per la manifestazione di effetti indesiderati è necessaria l'inibizione di entrambe le isoforme dell'enzima.

## 5.8 - Riproduzione

Le prostaglandine appaiono essere molto importanti durante l'intero processo riproduttivo. Già al momento del concepimento, una moltitudine di prostaglandine contenute nel liquido seminale (prodotto nella prostata da cui il nome), tra cui PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>3</sub> e PGF<sub>2α</sub>, hanno la funzione di contrarre la cervice, le tube di falloppio e l'utero per favorire il concepimento. Nel periodo successivo al concepimento le prostaglandine di tipo E, agenti sui recettori EP<sub>4</sub>, hanno la funzione di adattare il sistema cardiovascolare del feto alle normali condizioni operative e di mantenere dilatati i dotti arteriosi tra madre e feto. PGF<sub>2α</sub> è fondamentale nella fase del parto. Infatti, agendo sui recettori FP del corpo luteo, una ghiandola endocrina adibita alla produzione di ormoni vari, blocca la produzione di progesterone. Questo ha un ruolo fondamentale nell'inibire l'azione dell'ossitocina, un altro ormone che, durante il parto, svolge la funzione di contrazione dei muscoli. Pertanto la somministrazione di PGF<sub>2α</sub> induce il parto, mentre la somministrazione di FANS, in particolare di indometacina, lo rallenta o lo blocca.

Durante tali processi intervengono sia le COX-1 che le COX-2.

Esistono altri due casi in cui si nota l'importanza delle prostaglandine: iniezioni di PGE<sub>1</sub> sono utilizzate nel trattamento dell'impotenza, mentre è stato scoperto che l'eliminazione del gene della COX-2 nelle donne provoca l'infertilità bloccando l'ovulazione.

## 5.9 - Cancro

Sebbene siano ancora in fase di studio, le prostaglandine e i FANS hanno una notevole importanza nella mediazione dei processi vitali della cellula tumorale. È stato dimostrato infatti che un'assunzione moderata e costante di farmaci anti-infiammatori non steroidei riduce il rischio di contrarre varie forme di tumore. I meccanismi d'azione con cui i FANS interagiscono con le cellule tumorali sono molto complessi e non del tutto chiari. Tuttavia i test eseguiti suggeriscono alcuni dei meccanismi mediante i quali i FANS rivelano le loro proprietà chemio-preventive:

- Durante l'infiammazione i mastociti e i leucociti possono rilasciare radicali liberi, i quali possono intaccare molte parti delle cellule vicine, tra cui il DNA. Per cui la riduzione dell'infiammazione assumendo FANS è già considerabile un metodo di prevenzione del tumore.

- È stato scoperto che il tumore, producendo dal 40 al 90% di COX-2 in più, rispetto ad una cellula normale. Questo dato è molto importante poiché, per produrre metastasi, il tumore ha bisogno di produrre prostaglandine, che inducono l'angiogenesi e permettono al tumore di ramificarsi, alimentarsi e spostarsi all'interno dell'organismo. L'inibizione delle cicloossigenasi è dunque un buon metodo per negare al cancro l'espansione e la migrazione innescate dall'angiogenesi.

- È stato dimostrato che alte concentrazioni di FANS riescono a indurre l'apoptosi del tumore, interferendo nel pathway di vari recettori nucleari attivatori dell'RNA polimerasi, quali NFκB e PPAR. Tuttavia il fenomeno sembra essere mediato da altri enzimi, quali le lipoossigenasi.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Daniel L. Simmons, Regina M. Botting, and Timothy Hla – *Cyclooxygenase Isoenzymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition* – Pharmacol Rev 56:387 Vol.56 – 2004.
- 2) N.V. Chandrasekharan and Daniel L. Simmons – *The cyclooxygenases* – Genome Biology 5:241 Vol.9 – 2004.
- 3) Daniel L. Simmons, David Wagner and Kenneth Westover – *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Acetaminophen, Cyclooxygenase 2, and Fever* – Clinical Infectious Diseases 8:S211 Vol.31 – 2000.
- 4) Megumi Fujikawa, Takae Ibuki, Kiyoshi Matsumura and Teiji Sawa – *Inflammatory Hyperalgesia: The Role of the Prostaglandin System in the Spinal Cord* – Advances in Neuroimmune Biology 9:197 Vol.3 – 2012.
- 5) Cornelia M. Ulrich, Jeannette Bigler and John D. Potter – *Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics* – Nature 8:130 Vol.6 – 2006.
- 6) Patrick J. Loll, Daniel Picot and R. Michael Gravito – *The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase* – Nature 6:637 Vol.2 – 1995.
- 7) [en.wikipedia.org](http://en.wikipedia.org)



# RINGRAZIAMENTI

Ringrazio molto le persone che hanno contribuito alla mia esperienza in collaborazione all'università, soprattutto:

- Stefano Moro, il professore dell'università di Padova che ha reso possibile la mia ricerca.
- Giuseppe Deganutti, il dottorando che mi ha seguito durante questo percorso.
- Mauro Tonellato, il professore della mia scuola che mi ha aiutato e sostenuto per l'intera durata dell'esperienza.
- Nicoletta Bertocco, la quale mi ha dato la possibilità di entrare in contatto con l'università.

E ringrazio tutti coloro a cui ho chiesto consiglio nella fase di elaborazione dati e stesura, tra cui Lucia Pucci ed Ettore Carraro.